

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

WANDER BARROS DO CARMO

**EFEITO DO POLÍMERO QUITOSANA FERRO (III) INSOLÚVEL NA
FOSFATEMIA E NO DISTÚRBO MINERAL-ÓSSEO EM RATOS
URÊMICOS.**

Juiz de Fora

2017

WANDER BARROS DO CARMO

**EFEITO DO POLÍMERO QUITOSANA FERRO (III) INSOLÚVEL NA
FOSFATEMIA E NO DISTÚRBO MINERAL-ÓSSEO EM RATOS
URÊMICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hêlady Sanders Pinheiro

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

do Carmo, Wander Barros.

Efeito do polímero quitosana ferro (III) insolúvel na fosfatemia e no distúrbio mineral-ósseo em ratos urêmicos. / Wander Barros do Carmo. -- 2017.

103 f.

Orientadora: Hélydy Sanders Pinheiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2017.

1. Hiperfosfatemia. 2. Insuficiência renal crônica. 3. Distúrbio mineral e ósseo. 4. Ferro. 5. Quitosana. I. Pinheiro, Hélydy Sanders, orient. II. Título.

WANDER BARROS DO CARMO

**EFEITO DO POLÍMERO QUITOSANA FERRO (III) INSOLÚVEL NA
FOSFATEMIA E NO DISTÚRBO MINERAL-ÓSSEO EM RATOS
URÊMICOS.**

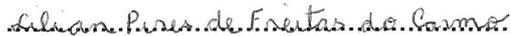
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em 19 de SETEMBRO de 2017.

Banca Examinadora:



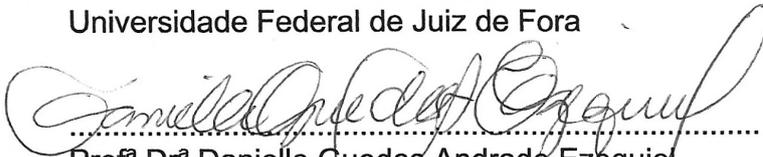
Prof^a Dr^a Melani Ribeiro Custódio
Universidade de São Paulo



Prof^a Dr^a Lilian Pires de Freitas do Carmo
Universidade Federal de Minas Gerais



Prof^o Dr^o Marcus Gomes Bastos
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof^a Dr^a Danielle Guedes Andrade Ezequiel
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora

2017

DEDICATÓRIA:

Dedico esse trabalho aos meus pais Sebastião (*in memoriam*) e Aparecida, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim. Desejo poder ter sido merecedor do esforço dedicado por vocês em todos os dias de suas vidas. Hoje a vitória também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Priscylla, minha esposa. Poderia dizer que este trabalho seria minha obra mais importante até o momento, porém o que seria de mim sem você? Poder contar com alguém capaz de te amar e gerar transformações preciosas na maneira de viver é um privilégio, que graças a Deus em tenho. Obrigado por estar sempre do meu lado e me ajudar enormemente nesta caminhada.

Arthur, Samuca e Nicolas, meus filhos. Por serem meu objetivo de vida, e por me ensinarem a cada dia como se vive a vida.

Aos meus irmãos Wilson e Rosemary sempre na luta do dia a dia, mas nunca sem se esquecerem de que família se faz com o apoio de cada um nos momentos de dificuldades e necessidades. A minha mãe, Aparecida, que mesmo já cansada pela caminhada da vida, demonstra ternura e amor de uma criança. E a meu pai, Sebastião, levado deste mundo pelos anjos durante esta jornada, mas que sempre estará ao meu lado.

A João Bosco e Maria Eudoxia, sogro e sogra. A Maria de Fátima, carinhosamente chamada de tia Tata pelos mais próximos. Obrigado por terem apoiado a mim e minha família nos momentos difíceis desta caminhada. Sem suas contribuições, com certeza o caminho seria mais sinuoso.

A Hugo Vieira Fajardo, por sua disponibilidade e contribuição nas interpretações dos resultados laboratoriais do presente estudo.

A Dr^a Helady Sanders Pinheiro. Tê-la como orientadora é um privilégio de quem pode ter ao lado alguém que transmita força nas adversidades e que demonstre capacidade de vencer quando as dificuldades lhe consome. Sua força de lutar e chegar ao seu objetivo é contagiante. Obrigado por me ensinar isso.

A Bárbara Bruna Abreu de Castro. Estivemos juntos desde o início desta empreitada e foi muito gratificante compartilhar cada dia deste desafio. Agradeço por tudo que me ensinou, pois tudo que aprendi no “mundo experimental” devo a você. Como modesta retribuição, sempre estarei aqui se precisar de alguma contribuição.

A todos os profissionais do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF que dedicam cada momento de seu trabalho para manter a excelência. Agradeço todo o apoio oferecido tornando capaz a realização deste trabalho.

Aos amigos da Fundação IMEPEN, por me apoiarem em todos os momentos de minha vida profissional, fazendo parte de cada vitória que conquistei. Não foi diferente para esta fase. Obrigado de coração e reconheço em vocês uma referência como grupo vitorioso.

Aos amigos do LIM16 que contibuiram com seu trabalho de excelência na produção de meus resultados.

Dr^a Vanda Jorgetti, profissional de conhecimento infinito e com uma alma generosíssima. O país necessita de mais pessoas assim. Agradeço pela recepção e grande contribuição com suas orientações.

Dr^a Melani Ribeiro Custódio, por ser capaz de transimitir naturalmente orientações tão valiosas que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

Dr^o Clóvis Antônio Rodrigues, agradeço por ter papel fundamental nesta obra, contribuindo com o produto utilizado em nosso estudo. A parceria foi de grande importância e desejo que seja duradoura.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta.

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se por múltiplas alterações metabólicas e clínicas que levam a alta taxa de morbimortalidade em longo prazo. O distúrbio mineral ósseo relacionado a DRC é caracterizado por alterações laboratoriais, modificações no metabolismo ósseo e calcificações de tecidos não ósseos. O tratamento de tal distúrbio é complexo, e uma das terapias mais comumente utilizada é o uso de substâncias quelantes de fosfato. Existem muitas opções de quelantes no mercado, porém ultimamente os quelantes sem conteúdo cálcico são formulações de escolha por proporcionar efeito quelante associado a menor risco de calcificação vascular. Uma nova classe de quelantes não cálcicos foi recentemente introduzida com resultados promissores, tendo como elemento quelante principal o ferro. Um novo polímero de quitosana e ferro foi produzido no Laboratório de Química da Universidade do Vale do Itajaí e demonstrou nos primeiros testes in vivo e in vitro ação quelante de fosfato em animais com função renal normal. **Objetivos:** avaliar a ação quelante de fosfato do polímero quitosana ferro(III) (QTS-Fe III) em animais com DRC e sua ação no metabolismo ósseo. **Métodos:** Avaliamos 120 animais, divididos igualmente em 5 grupos: controle, DRC, QTS-Fe III, DRC/QTS-Fe III e DRC/carbonato de cálcio (DRC/CaCO₃), ao longo de 7 semanas. A DRC foi induzida por dieta enriquecida com adenina (0,75% nas primeiras 4 semanas e 0,1% nas 3 semanas seguintes), suplementada com 1% de fósforo. O polímero QTS-Fe III foi administrado na dose de 30mg/kg/dia e o CaCO₃ na dose de 500mg/kg/dia, por gavagem, ambos a partir da terceira semana até o final do estudo. Todos os animais receberam uma dieta suplementada com 1% de fósforo. Oito animais de cada grupo foram eutanasiados nas semanas 4, 6 e 7 para coleta de sangue, urina e fêmur. Foram avaliados no sangue e urina a função renal, distúrbio mineral e ósseo e foi feita histomorfometria para avaliação da doença óssea. O grupo DRC apresentou: elevação significativa da creatinina em relação ao controle ($0,47 \pm 0,25$ vs $0,95 \pm 0,21$ mg/dl, $p = 0,001$), hiperfosfatemia ($6,82 \pm 0,52$ vs $10,6 \pm 2,49$ mg / dl; $p = 0,001$), elevada fração excretada de fósforo (FeP) ($0,2 \pm 0,17$ vs $0,71 \pm 0,2$; $p = 0,0001$) e maiores níveis de FGF23 ($7,42 \pm 1,96$ vs. $81,36 \pm 37,16$ pg/ml, $p = 0,011$). O uso dos quelantes proporcionou redução significativa de FeP (Controle: $0,71 \pm 0,20$, DRC/QTS-Fe III: $0,40 \pm 0,16$, DRC/CaCO₃: $0,34 \pm 0,15$, $p = 0,001$), sem alteração do FGF23. A histomorfometria mostrou uma doença óssea de alta remodelação nos animais urêmicos que não foi alterada com o uso dos quelantes. **Conclusão:** QTS-Fe III reduziu a sobrecarga de fosfato, sem causar alterações no nível sérico de FGF23 ou no perfil da doença óssea. Estes resultados corroboram para a ação da QTS-Fe III como um potencial quelante de fosfato não cálcico.

Palavras-chave: Hiperfosfatemia. Insuficiência renal crônica. Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica. Ferro. Quitosana.

ABSTRACT

Introduction: The Chronic Kidney Disease (CKD) is characterized by multiple clinical and metabolic changes that lead to long-term high rates of morbidity and mortality. The CKD mineral and bone disorder (CKD-MBD) is characterized by abnormal laboratory results, bone metabolic variations and soft tissue calcifications. CKD-MBD requires a complex treatment based on phosphate binders substances. There are many options of phosphate binders available on market, however calcium-free formulations are preferable in order to provide a binding phosphate's effect with lower risk of vascular calcification. A new class of calcium-free phosphate binders, in which iron is the main binder element, was recently introduced and has presented promising results. A new polymer of chitosan and iron was developed at Universidade do Vale do Itajaí Chemical's Laboratory and have shown phosphate's binder activity on primary tests in vivo and in vitro tests in animals with normal renal function.

Objective: to evaluate the phosphate chelator effect of the chitosan-Fe III polymer (QTS-Fe III) and its activity in bone metabolism in animals with CKD. We evaluated 120 animals, divided equally into 5 groups: control, CKD, QTS-Fe III, CKD/QTS-Fe III and CKD/Calcium carbonate (CKD/CaCO₃), over 7 weeks. We induced CKD by feeding animals with an adenine-enriched diet (0.75% in the first 4 weeks and 0.1% in the following 3 weeks) supplemented with 1% phosphorus. We administered 30mg/kg daily of the QTS-Fe III polymer and 500mg/kg daily of the CaCO₃, by gavage, both from the third week until the end of the study. Eight animals from each group were submitted to euthanasia at weeks 4, 6 and 7 for collection of blood, urine and femur. By blood and urine tests we evaluated renal function and bone metabolic disorder, and by bone disease by bone histomorphometry.

Results: The DRC group presented a significant elevation of creatinine in relation to the control (0.47 ± 0.25 vs 0.95 ± 0.21 mg / dl, $p = 0.001$), hyperphosphatemia (6.82 ± 0.52 vs 10.6 ± 2.49 mg/dl; $p = 0.001$), elevated excreted phosphorus fraction (FeP) (0.2 ± 0.17 vs 0.71 ± 0.2 ; $p = 0.0001$) and higher FGF23 (7.42 ± 1.96 vs. 81.36 ± 37.16 pg/ml, $p = 0.011$). The use of chelators provided significant reduction of FeP (Control: 0.71 ± 0.20 , CKD/QTS-Fe III: 0.40 ± 0.16 , CKD/CaCO₃ : 0.34 ± 0.15 , $p = 0.001$), without alteration of FGF23 levels. Histomorphometry showed a high turnover bone disease in uremic animals that was not altered with the use of chelators.

Conclusion: QTS-Fe III reduced the phosphate overload, without causing changes in the FGF23 serum level or bone disease profile. These results corroborate to the QTS-Fe III activity as a potential calcium-free phosphate binder.

Keywords: Hyperphosphatemia. Renal insufficiency, chronic. Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. Iron. Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia do distúrbio mineral-ósseo da DRC	17
Figura 2 - Comparação das estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosana	33
Figura 3 - Desenho do estudo	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de classificação TMV para a osteodistrofia	23
Tabela 2 - Agentes quelantes de fósforo utilizados em pacientes com DRC	27
Tabela 3 - Principais aplicações da quitina e da quitosana	34

LISTA DE SIGLAS

1,25(OH)₂D₃	1,25-dihidroxicolecalciferol
CaCO₃	Carbonato de cálcio
CaR	Receptor de cálcio
Cl-Sev	Cloridrato de Sevelamer
Clcr	Depuração da Creatinina
CV	Calcificação Vascular
CYP24A1	Gene Citocromo P450 família 24 subfamília membro A1 (degradação 1,25(OH) ₂ D ₃)
CYP27B1	Gene Citocromo P450 família 27 subfamília membro B1 (síntese 1 α -hidroxilase)
DCV	Doença cardiovascular
DMO	Distúrbio Mineral Ósseo
DMO-DRC	Distúrbio Mineral e Ósseo da DRC
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOA	Doença Óssea Adinâmica
DRC	Doença Renal Crônica
FeP	Fração de Excreção Urinária de Fósforo
Fe(NO₃)₃	Nitrato de ferro III
FGF-23	Fator de Crescimento Fibroblástico 23
HCl	Ácido clorídrico
HPT	Hiperparatireoidismo
HPTS	Hiperparatireoidismo Secundário
hrPTH	Paratormônio recombinante humano
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KMnO₄	Permanganato de potássio
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos 1
NaOH	Hidróxido de sódio
NKF	National Kidney Foundation
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
ODR	Osteodistrofia renal
PA21	Oxihidroxido sucro-férrico (Velphoro®)
PTH	Paratormônio
PTHi	Paratormônio intacto
PTH1R	Receptor do PTH
QTS	Quitosana
QTS-Fe(III)	Quitosana Ferro III
QTS-Fe(III)R	Quitosana Ferro III Reticulada
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
RNA	Ácido ribonucleico
RANKL	Ativador do receptor do ligante kappa-B do fator nuclear
RUNX2	Fator de transcrição 2 (diferenciação de osteoblastos)
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
TRS	Terapia Renal Substitutiva
VDR	Receptor da vitamina D

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 DISTÚRPIO MINERAL ÓSSEO NA DRC	15
1.1.1 Hiperparatireoidismo secundário a DRC	16
1.1.2 Cálcio	17
1.1.3 Fósforo	18
1.1.3.1 Fósforo urinário e Fração excretada de fósforo	18
1.1.4 Fator de crescimento fibroblástico (FGF 23)	19
1.1.5 Paratormônio (PTH)	20
1.1.6 Vitamina D	22
1.2 OSTEODISTROFIA RENAL	22
1.2.1 Osteodistrofia de alto turnover	23
1.2.2 Osteodistrofia de baixo tunover	23
1.2.3 Osteodistrofia de alto turnover associada a deficiência de mineralização	24
1.3 MODELO EXPERIMENTAL	24
1.3.1 Descrição do modelo	24
1.3.2 Hiperparatireoidismo secundário e o modelo animal	25
1.4 QUELANTES DE FÓSFORO	26
1.4.1 Sais de cálcio	27
1.4.2 Sais de magnésio	28
1.4.3 Sais de alumínio	28
1.4.4 Carbonato de lantânio	29
1.4.5 Sais de ferro	29
1.4.6 Sevelamer	30
1.4.7 Quitosana – goma de mascar	31
1.5 COMPLEXO QUITOSANA FERRO INSOLÚVEL	31
1.5.1 Quitina e Quitosana	31
1.5.2 Complexo Quitosana-Ferro	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 HIPÓTESES	37
4 OBJETIVOS	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 ANIMAIS	39
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
5.3 TRATAMENTO COM QUELANTE DE FOSFATO	41
5.3.1 Polímero QTS-Fe III insolúvel	42
5.3.2 Carbonato de cálcio	43
5.4 PARÂMETROS AVALIADOS	43
5.4.1 Peso	43

5.4.2 Avaliações no soro e urina	43
5.4.3 Função renal	43
5.4.4 Eficiência quelante	43
5.4.5 Histomorfometria óssea	44
5.4.5.1 Análise do tecido ósseo	45
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
6. RESULTADOS	47
6.1 ARTIGO 1	48
6.2 ARTIGO 2	62
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	95

INTRODUÇÃO:

Após a melhor definição dos critérios adotados para o diagnóstico da Doença Renal Crônica (DRC) pela National Kidney Foundation (K/DOQI, 2002), estudos epidemiológicos veem mostrando alta prevalência desta patologia. No estudo AusDiab foi observada uma prevalência de 12,1% de DRC na população (CHADBAN, 2003), resultado semelhante aos encontrados tanto no estudo NHANES III, que mostrou uma prevalência de 11% de DRC na população norte americana (ATKINS, 2005), enquanto estudo chinês que sugeriu uma prevalência similar de 12,1% de DRC (CHEN, 2009). Estes valores se tornam ainda mais alarmantes quando restringimos a análise de prevalência à população diabética. Em um estudo espanhol realizado em 2008, foi encontrada uma prevalência de 34,6% de DRC em pacientes diabéticos (LOU ARNAL, 2010), o que reforça a relação entre a DRC e outras doenças crônicas como, por exemplo, a diabetes mellitus e a hipertensão arterial sistêmica (LEVEY, 2005 e CODREANU, 2006).

A alta prevalência da DRC, associada à sua relação com outras doenças de elevada mortalidade como a hipertensão arterial sistêmica e a diabetes mellitus, a coloca como a 12^a maior causa de morte no mundo (NUGENT, 2011). Neste contexto devemos considerar a presença de complicações inerentes à perda da função renal como a anemia, a acidose, a hipercalemia, a hiperfosfatemia e o hiperparatireoidismo (HPT). Tais complicações, além de apresentarem elevadas prevalências, como por exemplo o HPT que pode atingir aproximadamente 40% na DRC, contribuem expressivamente para a alta mortalidade cardiovascular (ARAUJO, 2003; MORANNE, 2009; BHAN, 2010; HERBERTH, 2010).

O hiperparatireoidismo secundário à doença renal crônica (HPTS) é caracterizado pela hiperplasia da glândula paratireóide e elevação dos níveis do paratormônio (PTH), que surgem com a progressão da DRC. Sua patogênese está vinculada, de uma maneira bastante simplificada, a três fatores resultantes da redução da massa renal: deficiência da vitamina D, sobrecarga de fósforo e hipocalcemia. Como consequências clínicas surgem a Osteodistrofia Renal (ODR) e o Distúrbio Mineral e Ósseo da DRC (DMO-DRC). Com o objetivo de prevenir ou pelo menos amenizar a evolução do HPTS, a terapia concentra-se em dois pontos principais: reposição de vitamina D e redução da sobrecarga de fósforo (MITTMAN, 2010).

Até o momento, muitas são as opções de terapias que associadas à restrição dietética, atuam na redução da sobrecarga de fósforo. Várias classes de medicações com capacidade de adsorção de fósforo (quelantes de fósforo) foram e são utilizados até o

momento: desde o antigo e praticamente proscrito hidróxido de alumínio, passando pelos compostos a base de cálcio: carbonato ou acetato de cálcio; chegando às formulações mais recentemente produzidas como o hidrocloreto ou carbonato de sevelamer e o carbonato de lantânio. Porém, a tendência da não utilização de quelantes a base cálcio, devido à relação destes com risco de calcificação, levou a comunidade científica à procura de novas opções farmacológicas isentas de cálcio (MOE, 2003). Neste contexto, estudos recentes apresentam novas opções de quelantes isentos de cálcio como aqueles a base de ferro, a goma de mascar a base de quitosana e um novo complexo ainda em fase de estudo pela Universidade do Vale do Itajaí, no Brasil, constituído de quitosana e ferro (complexo QTS-Fe III) (SAVICA, 2009; GEISSER, 2010; SCHÖNINGER, 2010). Este polímero possui boa capacidade de adsorção do fosfato tanto *in vitro* (FAGUNDES, 2011), quanto *in vivo*, apresentando uma redução do fosfato sérico de aproximadamente 30% em animais tratados (BAXTER, 2000; BÜRGER, 2001). Tais resultados, aliado à baixa liberação de ferro deste composto confere uma opção atraente para o tratamento da hiperfosfatemia em pacientes com DRC (LOGHAMAN-ADHAM, 2003; SCHÖNINGER, 2007).

Deste modo, apesar dos estudos apresentarem até o momento resultados que sugerem o complexo QTS-Fe III como potencial quelante de fósforo, não há estudo comprovando seu uso como tal em animais com DRC. Nós propusemos então a avaliar os efeitos do complexo quitosana-ferro sobre o DMO-DRC em um modelo experimental de ratos com DRC.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Distúrbio Mineral/Ósseo na DRC:

Até o ano de 2009 apenas a ODR era utilizada para referir-se às alterações advindas do HPTS. Naquele ano o *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* realizou uma reavaliação e foram propostos dois termos distintos, a ODR e o DMO-DRC. A ODR define as alterações na histologia óssea encontradas na biópsia óssea. Enquanto que, o DMO-DRC refere-se à síndrome que engloba as alterações clínicas, bioquímicas e ósseas (remodelação, mineralização e volume ósseo), além das calcificações extra-ósseas presentes na DRC (SBN, 2008; KDIGO, 2009).

O DMO-DRC é uma das mais graves complicações entre as que acometem os pacientes com DRC (BLOCK, 2004; SBN, 2008; MOE, 2009; MEJÍA, 2011). A prevalência

do DMO-DRC é bastante elevada na população de renais crônicos já que seu conceito engloba qualquer alteração clínica, bioquímica e óssea, e quando consideramos então pacientes na categoria 5 da DRC pode chegar a 100%. (LEVIN, 2007; CARTER, 2008).

1.1.1 Hiperparatireoidismo secundário a DRC:

O hiperparatireoidismo secundário (HPTS) é caracterizado pela hiperplasia das glândulas paratireóides, elevados níveis séricos do paratormônio (PTH) e uma doença óssea de alto remanejamento. É uma complicação frequente nos pacientes em diálise e pode desenvolver-se cedo no curso da DRC (HRUSKA, 1995; SHERRARD, 1993; SAMPAIO, 2008). Está associado com um risco aumentado de calcificação cardiovascular e mortalidade (GANESH, 2001). Araújo e cols. observaram que a prevalência de HPTS no Brasil elevou-se de 32,3% na década de 80 para 44% nos anos 90 (ARAÚJO, 2003).

Vários têm sido os fatores implicados na patogênese do HPTS destacando-se a retenção de fósforo e hiperfosfatemia, a deficiência de vitamina D, a hipocalcemia, as anormalidades do receptor sensível ao cálcio (CaR) e do receptor da vitamina D (VDR) das paratireóides, a resistência óssea à ação do PTH e, mais recentemente, as fosfatoninas (HRUSKA, 1995; SILVER, 2002; MARTIN, 2007). É importante enfatizar que, embora abordados separadamente, estes fatores estão interrelacionados podendo um ou mais deles predominar de acordo com o tipo e a fase da DRC.

A hiperestimulação crônica do PTH é seguida de proliferação das células paratireóides levando a uma hiperplasia difusa, progressiva e policlonal das glândulas paratireóides. Subsequentemente, este padrão de crescimento pode se transformar em um tipo monoclonal benigno, porém mais agressivo, ou policlonal. Nesse caso, as glândulas tornam-se então muito aumentadas exibindo uma hiperplasia nodular, com redução dos VDR e CaR, quando comparadas às glândulas difusamente hiperplásicas, promovendo a resistência das paratireóides ao calcitriol e ao cálcio. (HRUSKA, 2014).

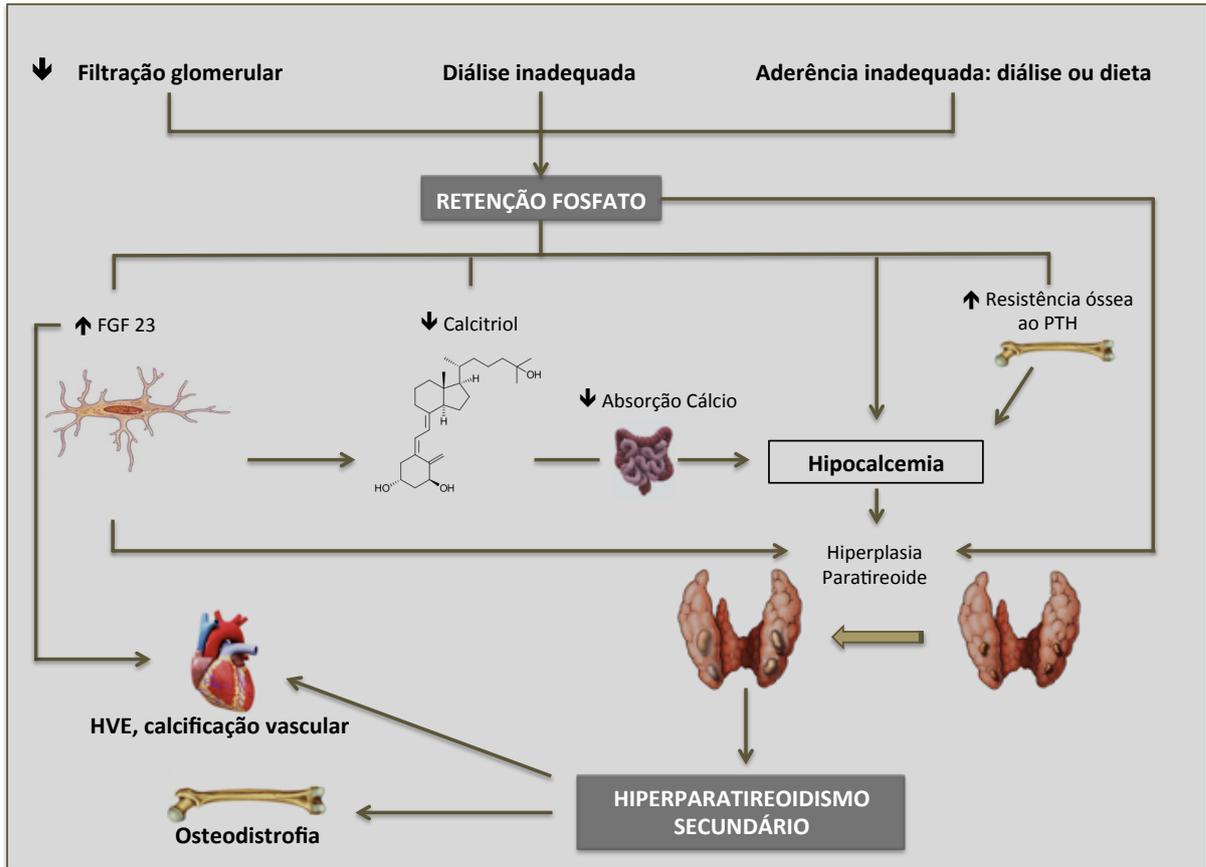


Figura 1: Fisiopatologia do Distúrbio mineral-ósseo na DRC. Adaptado de TONELLI, 2010

1.1.2 Cálcio:

Na DRC, os mecanismos fisiológicos para a manutenção da homeostase do cálcio ficam seriamente prejudicados. A diminuição da massa renal e outros eventos que serão descritos adiante levam à redução da síntese de calcitriol, o que diminui a absorção intestinal de cálcio e leva à hipocalcemia, a qual o organismo tenta compensar lançando mão de todos os seus mecanismos adaptativos. Há maior secreção e diminuição da degradação intracelular do PTH (em minutos), seguida de maiores transcrição de RNAm e estabilidade dessa proteína (horas) e, finalmente, aumento da proliferação celular na paratireoide (dias). Essa proliferação é acompanhada de alterações cromossômicas evidentes, com diminuição da expressão do receptor de cálcio, tornando a glândula ainda menos responsiva ao cálcio. Finalmente, a curva cálcio-PTH de um paciente com DRC e HPTS é geralmente desviada para a direita, em que concentrações cada vez maiores de cálcio serão necessárias para inibir a secreção de PTH, até que esta inibição não mais ocorra (MALBERTI, 1999; GOODMAN, 2008).

1.1.3 Fósforo:

De maneira semelhante ao cálcio, a maior parte do fósforo do corpo humano encontra-se no esqueleto (85%), no fluido extracelular, sob a forma de fosfato inorgânico, e nos tecidos moles, na forma de ésteres de fosfato. Assim, tanto a concentração intracelular de fósforo como a plasmática são baixas. O fósforo participa não só da composição do tecido ósseo, mas também de inúmeras reações bioquímicas envolvidas em geração e transferência de energia (BANSAL, 1990; JORGETTI, 2007; KIELA, 2009).

Embora o PTH seja o hormônio responsável pela regulação do cálcio sérico, sabe-se que também exerce seus efeitos na homeostase do fósforo. Quando ocorre hipocalcemia, a elevação conseqüente do PTH também leva à liberação de fósforo dos ossos, assim como eleva a absorção intestinal deste íon mediada pelo aumento da síntese de calcitriol. No entanto, níveis elevados de PTH aumentam a excreção urinária de fósforo, provavelmente como mecanismo compensatório para evitar a hiperfosfatemia durante a tentativa de correção de hipocalcemia (KIELA, 2009).

Na DRC, o fósforo tem ação direta e indireta sobre a secreção do PTH. Sua ação indireta se dá por via hipocalcêmica, pois a retenção de fósforo induz a hipocalcemia através de mecanismos puramente físico-químicos e/ou por inibição da atividade da 1- α -hidroxilase. Além disso, a hiperfosfatemia, por aumentar a resistência óssea ao PTH, também leva à hipocalcemia. A ação direta ocorre por um aumento na estabilidade do RNAm de PTH e na proliferação das células paratireoidianas (SILVER, 2000). Embora o efeito direto do fósforo sobre a glândula esteja bem estabelecido, até o momento não se identificou um receptor específico desse mineral nas células paratireoidianas. Outra ação do fósforo é observada na hiperfosfatemia, quando ocorre diminuição da expressão dos receptores de cálcio e calcitriol nas células da paratireóide, reduzindo ainda mais a sensibilidade da glândula tanto ao cálcio como ao calcitriol (RODRIGUEZ, 2005; GOODMAN, 2008).

1.1.3.1 Fósforo urinário e Fração excretada de fósforo:

Em um adulto normal, com taxa de filtração glomerular (TFG) de 120 mL/min (174 L/dia) e concentração sérica de fosfato de 4,0 mg/dL (40 mg/dL), a carga filtrada de fósforo é de 40 mg/dL x 174 L/dia \cong 7.000 mg/dia. Cerca de 88% do fósforo filtrado é absorvido pelos túbulos. Os 12 % excretados na urina, embora constituam uma parcela minoritária da carga filtrada, são essenciais à excreção de ácidos fixos sob a forma de ácido

titulável. A maior parte dessa absorção (60 a 70% da carga filtrada) ocorre no túbulo proximal, sendo o restante (10 a 20 % da carga filtrada) absorvido nos segmentos distais do néfron. À medida que sobe a concentração plasmática de fósforo, e portanto sua carga filtrada, a respectiva taxa de absorção tubular também se eleva. O mecanismo de absorção é no entanto rapidamente saturado, o que faz com que a carga excretada de fósforo aumente em proporção à carga filtrada. O transporte renal de fósforo também é regulado por outros fatores além da concentração sérica, como o paratormônio, o FGF23 e a vitamina D (SUKI, 2015; REIS, 2002).

Como as mudanças no metabolismo do fosfato ocorrem precocemente na DRC sem necessariamente cursar com elevação dos seus níveis séricos, a medida da fração de excreção urinária de fósforo (FeP) é uma importante ferramenta no diagnóstico e manejo de tal distúrbio, seja na população com ou sem DRC (PHELPS, 2015a; PHELPS, 2015b).

1.1.4 Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF 23)

O FGF 23 pertence à família dos fatores de crescimento de fibroblastos e foi descrito pela primeira vez no ano de 1994 como uma fosfatonina, sendo naquela ocasião descrito como um fator responsável pelo transporte tubular de fósforo dependente de sódio (CAI, 1994; ECONS, 1994; MCKEEHAN, 1998; MARTIN, 1998; YAMASHITA, 2000 e OLIVEIRA, 2010). Ao contrário do PTH, o FGF-23 não só aumenta a excreção de fósforo urinário como também reduz a síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, levando a um balanço negativo de fósforo (BERNEDT, 2005).

Diversos tecidos expressam o FGF-23, tais como o tecido ósseo, vasos na medula óssea, núcleo talâmico ventrolateral, timo e linfonodos (LIU, 2003). A contribuição relativa destes tecidos na expressão do FGF-23 não é conhecida, mas os altos níveis de expressão pelos osteócitos sugerem que o tecido ósseo é a principal fonte de FGF-23 (LIU, 2007).

O FGF23 está presente na circulação humana em várias formas principais. A forma ativa, o FGF23 intacto (iFGF23), a forma inativa, o C-terminal (cFGF23), e um fragmento N-terminal (BHATTACHARYYA, 2012; NITTA, 2014). Até o momento a molécula iFGF23 é considerada como a espécie biologicamente ativa em relação aos efeitos diretos sobre o metabolismo do fosfato e da vitamina D, enquanto o fragmento cFGF23 quando elevado demonstrou ação inibitória sobre o iFGF23 (GOETZ, 2009). Porém, permanece em aberto se os produtos de degradação do FGF23 poderiam ou não exercer alguma outra atividade biológica (BERNDT, 2007; KURO-O, 2017).

Há algum tempo especula-se sobre os mecanismos pelos quais o FGF-23 atuaria no metabolismo do fósforo na DRC. Assim, a hipótese de que a síntese de FGF-23 fosse induzida pela retenção de fósforo é bastante atraente (FUKAGAWA, 2005). Diversos autores mostram correlações entre os níveis de FGF-23, creatinina, fósforo e PTH séricos em pacientes com DRC não-dialítica (WEBER, 2003; LARSSON, 2003; IMANISHI, 2004; SHIGEMATSU, 2004). Porém devemos considerar que existem diferenças importantes na forma como o FGF23 é regulado em indivíduos com função renal normal e naqueles com DRC. Como relatado anteriormente, existe uma correlação clara entre os níveis de fosfato e o FGF23, porém na fase inicial da DRC os níveis séricos de FGF23 já se encontram elevados, mesmo antes que ocorra a hiperfosfatemia sugerindo que, inicialmente, exista uma regulação primária do fosfato e do PTH pelo FGF23 (ISAKOVA, 2011; GRACIOLLI, 2017). Embora a perda da depuração renal do FGF23 seja uma das justificativas para elevação do FGF23 precocemente (LARSSON, 2003), não parece elucidar todo o processo. Outros fatores, comumente presentes na DRC como a inflamação e a deficiência de ferro, podem contribuir para maior atividade do FGF23 e estão sendo estudados na atualidade (MENDOZA, 2012; DAVID, 2017; HONDA, 2017).

Estudos clínicos mostraram associação dos níveis elevados de FGF-23 e progressão de DRC (FLISER, 2007; TITAN, 2009), desenvolvimento de HPTS grave (NAKANISHI, 2005), hipertrofia de ventrículo esquerdo (GUTIERREZ, 2009) e mortalidade (GUTIERREZ, 2008). Além dessas possíveis associações, o FGF-23 pode também estar relacionado à calcificação vascular (JEAN, 2009a; JEAN, 2009b; CANCELA, 2011), justificando o importante elo entre o DMO/DRC e a mortalidade cardiovascular na DRC.

1.1.5 Paratormônio:

O PTH é um hormônio fundamental no controle da homeostase do cálcio, agindo direta ou indiretamente em órgãos relacionados ao armazenamento, à excreção e à absorção deste íon divalente. Discreta queda dos níveis circulantes de cálcio, por exemplo 10%, é suficiente para aumentar a secreção de PTH em 200% a 300% (PAULA, 2001; LANNA, 2002).

No tecido ósseo, o PTH aumenta o número e a atividade dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea, um dos mecanismos fisiológicos de retirada de cálcio do tecido ósseo. Essa ação não se dá diretamente, pois os osteoclastos não expressam receptores para PTH e não reagem ao hormônio quando isolados. Os osteoblastos, responsáveis pela

formação óssea, são as células que realmente respondem ao PTH, produzindo fatores capazes de estimular os osteoclastos e dessa forma promover a reabsorção óssea (RIANCHO, 2011; MATSUO, 2012).

No rim, o PTH aumenta a absorção tubular de cálcio. Esse efeito ocorre no túbulo distal, onde o PTH estimula a reabsorção de cálcio através da inserção de canais de cloro basolaterais, que hiperpolarizam a célula, aumentando a negatividade intracelular e promovendo o influxo de cálcio. O transporte de cálcio no interior das células tubulares é facilitado por proteínas como a calbindina, cuja síntese é estimulada pela 1,25 (OH)₂D₃, a qual também é estimulada pelo PTH. Além dessa ação sobre o cálcio, o PTH aumenta a excreção urinária de fósforo, atuando sobre o túbulo proximal, inibindo o co-transporte luminal de sódio e fósforo. (RAINONE, 2011; PENIDO, 2012; QUARLES, 2012; SPIEGEL, 2012; MURRAY, 2013)

Na última década, a imagem do PTH como hormônio com ação exclusivamente catabólica sobre o tecido ósseo mudou radicalmente, estando claro que este pode promover tanto formação quanto reabsorção óssea. O hiperparatireoidismo primário clássico e o hiperparatireoidismo secundário à DRC são dois exemplos tradicionais que indicam que a exposição óssea a níveis constantemente elevados de PTH favorece o catabolismo ósseo (PAULA, 2009). Por outro lado, a exposição óssea a níveis elevados de forma intermitente de PTH, especificamente o paratormônio recombinante humano (hrPTH 1-84) e o peptídeo recombinante humano 1-34 (teriparatida), favorecem o anabolismo. Sendo que desde o início desta década, o PTH passou a ser uma opção para o tratamento da osteoporose (BORBA, 2010; MISIOROWSKI, 2011).

A remodelação óssea que corresponde ao processo de renovação do esqueleto ocorre nas unidades ósseas multicelulares, onde pequenas porções de osso velho são retiradas pelos osteoclastos e posteriormente repostas pelos osteoblastos. A atividade de remodelação óssea sofre influência de fatores genéticos, ambientais e hormonais e, quando em condições favoráveis, há equilíbrio entre reabsorção e formação. Diversas evidências sugerem que o efeito anabólico do PTH depende não só de sua ação direta sobre osteoblastos e precursores, como também da participação de fatores de crescimento como o “Insulin-like growth factor” 1 (IGF-I). O estímulo de formação envolve tanto o incremento de diferenciação de precursores de osteoblastos, quanto a proliferação e ação antiapoptótica dos osteoblastos. Em parte, esses efeitos dependem do aumento de expressão do fator de transcrição Runx2, um elemento-chave no processo de diferenciação de osteoblastos. Enquanto isso a elevação mantida de PTH estimula osteoblastos a produzir RANKL e MCP-1, fatores estimuladores da

osteoclastogênese e da atividade de reabsorção óssea realizada por osteoclastos maduros (PAULA, 2009; RIANCHO, 2011; MATSUO, 2012).

1.1.6 Vitamina D:

A DRC apresenta-se como um grande fator e risco para a redução dos níveis séricos de vitamina D ativa (também conhecida como 1,25(OH)₂vitamina D ou calcitriol). Com a progressão da DRC, a massa dos néfrons em funcionamento é diminuída, o que, combinado com maior carga de fosfato nos néfrons remanescentes e níveis mais altos de FGF23, resulta na deficiência de conversão nos rins de seus precursores, o ergocalciferol ou colecalciferol, em vitamina D ativa ou calcitriol (GOODMAN, 2007; HRUSKA, 2014). Uma vez convertido na forma ativa, o calcitriol será capaz de exercer suas influências biológicas com impacto sobre o metabolismo mineral e outras funções fisiológicas. A baixa produção de calcitriol, por sua vez, diminui a absorção intestinal de cálcio e leva à hipocalcemia, além de diminuir os níveis dos VDR nos tecidos, em particular, nas células da glândula paratireoide (NAVEH-MANY, 1999). Como o VDR nas células principais das glândulas paratireoides suprime a expressão do mRNA pre-pró-PTH, níveis mais baixos de calcitriol na circulação, em conjunto com baixo número de VDR nos pacientes com DRC, resultam na estimulação tanto da síntese como da secreção do PTH, deflagrando o HPTS com suas consequências no metabolismo ósseo (SILVER, 1985; HRUSKA, 2014).

1.2 OSTEODISTROFIA RENAL:

A ODR é o termo utilizado para descrever o componente da patologia óssea do DMO/DRC. Como dito anteriormente não é caracterizado por uma doença uniforme, e, dependendo da contribuição relativa dos diferentes fatores patogênicos e de seu tratamento, vários padrões da histologia óssea são expressos na DRC (HRUSKA, 2014).

Para avaliação e diagnóstico definitivo de osteodistrofia renal há necessidade da realização da biópsia óssea. Os resultados histomorfométricos, obtidos pela biópsia óssea, são reportados seguindo uma nomenclatura recomendada pela American Society for Bone and Mineral Research (PARFITT, 1987).

A fim de esclarecer a interpretação dos resultados da biópsia óssea na avaliação da osteodistrofia renal, foi acordado a utilização de três descritores histológicos: turnover, mineralização e volume do osso (sistema TMV) - com qualquer combinação de cada um dos

descritores possíveis (tabela 1). O esquema de classificação TMV fornece uma descrição clinicamente relevante da patologia óssea subjacente, avaliada pela histomorfometria, que por sua vez ajuda a definir a fisiopatologia e, assim, orientar a terapia.

Tabela 1 . Sistema de classificação TMV para a osteodistrofia:

Turnover	Mineralização	Volume
Baixo	Normal	Baixo
Normal		Normal
Alto	Anormal	Alto

TMV: Turnover/Mineralização/Volume ósseos

1.2.1 Osteodistrofia de alto turnover: Doença óssea relacionada ao hiperparatireoidismo / Osteíte fibrosa / Doença Mista

O excesso sustentado do paratormônio resulta em maior turnover ósseo, sendo encontrados osteoclastos, osteoblastos e osteócitos em abundância. A atividade osteoblástica prejudicada resulta em produção desordenada do colágeno e formação de ossos excessivamente esponjosos, conhecidos na literatura como ossos fibrosos ou woven bone. O acúmulo de osteoprogenitores fibroblásticos fora do processo de diferenciação osteoblástica resulta na deposição de colágeno (fibrose) nos espaços peritrabecular e medular. O componente não mineralizado do osso – osteoide – aumenta e a arquitetura tridimensional normal da osteoide é frequentemente perdida. Fendas osteoides não mais apresentam sua habitual birrefringência sob a luz polarizada. Elas produzem um padrão entrecortado típico sob a luz polarizada. A taxa de aposição mineral e o número de locais ativos de mineralização aumentam, como documentado sob luz fluorescente após a administração de marcadores fluorescentes (tetraciclina) em determinados intervalos de tempo (PARFITT, 1987).

1.2.2 Osteodistrofia de baixo turnover: Doença óssea adinâmica / Osteomalácia

A osteodistrofia urêmica de baixo turnover é a outra extremidade do espectro da osteodistrofia renal. O marco histológico desse distúrbio é uma redução profunda no turnover ósseo devido ao baixo número de locais ativos de remodelação, supressão da formação óssea e reabsorção óssea. A reabsorção óssea não é tão reduzida quanto a formação óssea, resultando em uma doença osteopênica de baixo turnover. A maior parte do osso trabecular é coberta por células mucosas, com alguns osteoclastos e osteoblastos, e a estrutura óssea é

predominantemente lamelar. A extensão das superfícies de mineralização cai acentuadamente, sendo geralmente observadas apenas algumas finas marcações com tetraciclina. Dois subgrupos podem ser identificados nesse tipo de osteodistrofia renal, dependendo da causa dos eventos que levam a uma diminuição na atividade osteoblástica: doença óssea adinâmica (DOA) e osteomalácia (PARFITT, 1987).

A osteomalácia de baixo turnover é caracterizada por um acúmulo da matriz não mineralizada precedido por uma diminuição na mineralização. Os ossos não mineralizados representam uma fração considerável do volume ósseo trabecular. O aumento no volume osteoide lamelar ocorre devido à presença de fendas osteoides largas que cobrem uma grande parte da superfície trabecular. A presença ocasional de osso fibroso (woven bone) em meio a trabéculas indica alto turnover ósseo pregresso. Quando presentes, os osteoclastos geralmente são vistos dentro do osso trabecular ou na pequena fração da superfície trabecular que foi deixada sem revestimento osteoide.

1.2.3 Osteodistrofia de alto turnover associada a deficiência de mineralização:

É causada principalmente pelo hiperparatireoidismo e mineralização defeituosa, com ou sem aumento na formação óssea. Essas características podem coexistir em graus variados em diferentes pacientes. Um incremento no número de sítios heterogêneos de remodelação pode ser observado, em geral aumentando também o número de osteoclastos. Devido aos focos ativos com inúmeras células, fendas osteoides entrelaçadas e fibrose peritrabecular coexistem ao lado dos sítios de arranjo lamelar com menor atividade. A maior produção de osteoide lamelar ou fibroso (woven bone) provoca acúmulo de osteóide com espessura normal ou maior das suas respectivas fendas. Embora as superfícies ativas de mineralização aumentem no osso fibroso com maior taxa de mineralização e marcação difusa, as superfícies de mineralização e marcação difusa, as superfícies de mineralização podem estar reduzidas no osso lamelar com menor taxa de aposição mineral (PARFITT, 1987).

1.3 MODELO EXPERIMENTAL:

Devido à complexidade e variadas formas de apresentação, para um estudo mais amplo do DMO há necessidade do uso de modelos experimentais.

1.3.1 Descrição do modelo:

Estudo realizado por Yokozawa et al. nas décadas de 70 e 80 utilizando a suplementação com adenina a 0,75% na dieta de ratos por um período de 30 dias mostrou perda progressiva da função renal, associada à redução importante do tamanho renal, depósito de cristais na luz tubular e no interstício. Além destes depósitos encontraram também degeneração e necrose do epitélio tubular além de fibrose intersticial. Estudo posterior, utilizando a suplementação com adenina por um período superior confirmou tais achados (YOKOZAWA, 1986).

A adenina (vitamina B4) é um importante componente do DNA e RNA, e quando ingerida por períodos prolongados, produz alterações histopatológicas semelhantes às encontradas na DRC. Embora a real causa de tais alterações não seja completamente conhecida, especula-se que os subprodutos formados no metabolismo da adenina sejam os responsáveis. Quando administrada por via oral é imediatamente metabolizada em 2,8-dihidroxiadenina, que precipita e forma cristais na superfície do epitélio tubular renal proximal, em apenas dois dias. O aumento da formação de tais cristais induz alterações degenerativas do epitélio, com elevação dos níveis séricos de creatinina e fosfato, além da queda dos níveis séricos de cálcio. A deterioração renal e dos parâmetros bioquímicos podem ser revertidos parcialmente para níveis normais, se a dieta com adenina for suspensa em até duas semanas. Entretanto, se a administração de adenina for mantida por período igual ou superior a quatro semanas, as lesões renais e a deterioração bioquímica tornam-se irreversíveis (OKADA, 1999; OGIRIMA, 2006; HEWITSON, 2008).

1.3.2 Hiperparatireoidismo secundário e o modelo animal:

Recentemente o modelo animal utilizando adenina para induzir a DRC ganhou especial atenção devido a seu desenho relativamente fácil associado à boa sobrevivência dos animais (SHOBEIRI, 2010). Este modelo, diferentemente de outros modelos, não requer procedimento cirúrgico, o que leva a alta taxa de sobrevivência ao final do estudo. Outro ponto positivo seria os altos níveis de creatinina sérica, atingidos após quatro semanas de tratamento, podendo chegar a valores de 3,0 a 10,5 vezes aos valores de animais controles. E ainda a elevação importante dos níveis de fósforo sérico (1,2 a 2,6 vezes) com flutuação mínima do cálcio sérico (SHOBEIRI, 2010).

Falando-se em HPTS neste modelo, a notável diferença estaria no tempo necessário para sua instalação e do surgimento das alterações ósseas secundárias ao HPTS.

Em um estudo utilizando ratos nefrectomizados a 5/6, os níveis séricos de PTHi atingiram 300 pg/mL quatro semanas após a cirurgia (SANCHEZ, 2004). Enquanto que, em ratos utilizando adenina por quatro semanas os níveis de PTHi chegaram a 1500 pg/mL com uma hiperplasia das glândulas paratireóides, após seis semanas de estudo, semelhantes ao experimento utilizando ratos parcialmente nefrectomizados com dieta rica em fósforo por 14 semanas (MILLER, 1998; TAMAGAKI, 2006). Já a lesão óssea, no mesmo estudo citado anteriormente, esteve presente com 12 – 14 semanas, comparada com alterações histológicas ósseas compatíveis com a ODR encontradas em apenas quatro semanas após a conversão de uma dieta suplementada com adenina para dieta normal (MILLER, 1998; TAMAGAKI, 2006).

Diferentemente dos dados relatados por Yokozawa et al, em um estudo piloto realizado em nosso centro, observamos que os animais apresentaram uma recuperação parcial da função renal após o período de 4 semanas (indução da DRC com adenina), o que poderia comprometer os resultados finais do estudo. Recentemente, Damment et al estudando os efeitos do carbonato de lantânio sobre alterações ósseas a longo prazo, utilizou o modelo descrito inicialmente com a introdução de uma dose de manutenção de adenina a 0,1% após três semanas de adenina a 0,75%. Tal modificação proporcionou a manutenção do nível da função renal até o término do experimento com 22 semanas (DAMMENT, 2011). Diante deste fato, utilizamos a dose de manutenção de 0,1% de adenina para obtermos a manutenção da DRC, induzida com 4 semanas de adenina a 0,75%, até a sétima semana quando o experimento foi encerrado.

1.4 QUELANTES DE FÓSFORO:

Na linha de tratamento da hiperfosfatemia utilizamos a restrição dietética para com alimentos ricos em fósforo e o tratamento de substituição da função renal (terapias dialíticas) (NKF, 2003; BMMENS, 2003). Assim, na maioria dos pacientes com DRC, os quelantes de fósforo tem uma importante contribuição na tentativa do adequado controle do fósforo associado a outras medidas farmacológicas e não farmacológicas (EMMETT, 2004).

Atualmente, várias são as classes de produtos quelantes de fósforo, como descrito na tabela abaixo. Estudos observacionais ou intervencionistas mostram que todos possuem eficácia na redução do fósforo sérico, sendo então a opção de escolha relacionada não só ao poder quelante, mas também a tolerabilidade, a ocorrência de eventos adversos e principalmente ao potencial de redução da morbidade e mortalidade cardiovascular.

Tabela 2. Agentes quelantes de fósforo utilizados em pacientes com DRC:

CLASSE	AGENTE
Compostos minerais	Carbonato de cálcio
	Acetato de cálcio
	Citrato de cálcio
	Hidróxido de magnésio
	Carbonato de magnésio
Compostos metálicos	Hidróxido de alumínio
	Carbonato de lantânio
	Sais de ferro
Polímeros não-absorvidos e resinas	Hidrocloreto de sevelamer
	Carbonato de sevelamer

Modificado de Molony, 2011.

O quelante de fósforo ideal seria aquele que possui grande capacidade de ligação ao fósforo ingerido na dieta associado a: mínima absorção sistêmica, poucos efeitos colaterais, fácil posologia e baixo custo. Infelizmente, como descrito abaixo, nenhum dos quelantes de fósforo orais disponíveis atualmente atendem a todos esses critérios.

1.4.1 Sais de Cálcio:

Os quelantes de fósforo a base de cálcio, carbonato de cálcio ou acetato de cálcio, têm sido utilizados por décadas em pacientes submetidos à terapia renal substitutiva (K/DOQI, 2003; YOUNG, 2005) e ambos parecem ter o poder quelante relativamente semelhante por grama de cálcio administrado (JANSSEN, 1996; K/DOQI, 2003). São os quelantes muito utilizados devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade (SAVICA, 2006; TONELLI, 2010). Não existem estudos controlados com placebo que analisaram o efeito destes agentes quanto a eventos finais tais como: mortalidade, eventos cardiovasculares, hospitalização e calcificação vascular (KDIGO, 2009). A análise de estudos comparando os dois componentes principais deste grupo, carbonato de cálcio e acetato de cálcio, é difícil de ser realizada, pois a grande maioria dos estudos utiliza formulações de variadas origens, além de se tratar de pequenas amostras. Reconhecendo tais limitações, uma meta-análise de ensaios comparando estes dois sais sugeriu que são semelhantes no poder de reduzir o fósforo sérico, sem diferença no potencial de induzir um evento adverso importante que é a hipercalcemia (NAVANEETHAN, 2009). Tal evento, possui significado clínico importante, gerando recentemente orientação quanto à redução, quando possível, na prescrição dos quelantes desta classe, por apresentar risco de potencialização da calcificação vascular (KDIGO, 2017).

1.4.2 Sais de Magnésio:

Embora sais de magnésio por via oral sejam utilizados como quelantes de fósforo por vários anos, poucos dados estão disponíveis a respeito de sua eficácia e segurança. Os níveis de magnésio sérico em pacientes submetidos à terapia dialítica tendem a ser mais elevados quando comparados a indivíduos com função renal preservada, e a hipermagnesemia está associada a uma grave complicação que é a parada respiratória. Tal evento pode ocorrer em decorrência da ingestão excessiva de magnésio com DRC dialítica (TONELLI, 2010).

Mais recentemente os sais contendo magnésio associado ao acetato ou carbonato de cálcio vem ganhando atenção, principalmente pelo potencial de redução da fosfatemia associado à redução da calcificação vascular e influência sobre os níveis séricos do FGF23 (SPIEGEL, 2007; TZANAKIS, 2008; TZANAKIS, 2009; COVIC, 2011). Outro agente em desenvolvimento é o hidroxicarbonato de ferro e magnésio, ainda em estudo e que pode levar a um bom controle do fosfato sérico com boa tolerância (McINTYRE, 2009).

1.4.3 Sais de Alumínio:

O hidróxido de alumínio é um agente efetivo como quelante de fósforo de acordo com resultados clínicos demonstrados desde os meados dos anos 70, quando foi amplamente utilizado (MOLONY, 2005). Nesta ocasião sua utilização seria justificada justamente pelo seu poder quelante associado ao não desenvolvimento de hipercalemia, fato comum aos quelantes a base de cálcio que tinham o potencial de promover a hipercalemia. O uso foi baseado em resposta clínica frente a redução da hiperfosfatemia e não baseado em ensaios clínicos controlados (MOLONY, 2005). Mais tarde, após a análise de séries de casos, seu uso foi suspenso devido a associação entre exposição crônica aos sais de alumínio por via oral e vários quadros tóxicos graves como miopatia, anemia microcítica, osteomalácia e demência (ALFREY, 1993; CANNATA-ANDIA, 2002). Atualmente a prescrição de quelantes a base de alumínio praticamente não é realizada, salvo casos isolados e por curto período de tempo.

1.4.4 Carbonato de Lantânio:

O carbonato de lantânio pode ser considerado outra substância efetiva na redução dos níveis de fósforo sérico através da redução da absorção no trato intestinal (MOLONY,

2011). Estudos *in vitro* têm demonstrado que o carbonato de lantânio é um quelante de fósforo eficaz (AUTISSIER, 2007), bem como estudos em animais e pacientes confirmam sua eficácia e segurança (NELSON, 2002; D'HAESE, 2003; HUTCHISON, 2006). Entretanto, críticas têm sido feitas à qualidade dos estudos que avaliam eventos clínicos na utilização do carbonato de lantânio, além de não existir nenhum estudo que tenha mostrado diferença significativa entre lantânio e cálcio relacionada à fratura óssea, qualidade de vida e complicações cardiovasculares. Outro dado importante seria o depósito de lantânio nos ossos de pacientes tratados por mais de 4,5 anos (CEDAC, 2008). De um modo geral, quando comparado ao carbonato de cálcio possui poder quelante de fósforo semelhante, com alguns estudos revelando maior taxa de eventos adversos principalmente do trato gastrointestinal. A vantagem clínica reside nos menores níveis séricos de cálcio encontrados nos pacientes em uso do carbonato de lantânio (FINN, 2006).

1.4.5 Sais de Ferro:

Os quelantes a base de ferro apresentam-se como uma promissora alternativa dentre as opções já existentes. Apesar da inexistência de grandes estudos avaliando tal classe de quelantes a longo prazo, estudos realizados até o momento sugerem boa efetividade, segurança e baixo custo (HERGESELL, 1999; GEISSER, 2010; GUTZWILLER, 2015; RODBY, 2015). A ação quelante de fosfato apresentada é semelhante aos outros produtos existentes até o momento, conforme descrito por HERGESELL e RITZ, onde pacientes com o diagnóstico de DRC apresentaram uma redução de aproximadamente 20% do fosfato sérico com uso de quelantes a base de ferro com redução do número de comprimidos utilizados (HERGESELL, 1999; GEISSER, 2010, WUTHRICH, 2013; FLOEGE, 2015). Vários quelantes de fosfato a base de ferro são estudados, mas no momento aqueles que apresentam maiores evidências científicas são o citrato férrico e o oxihidróxido sucro-férrico (PA21 - Velphoro®). O citrato férrico, por proporcionar absorção de parte do ferro de sua estrutura, deve ser utilizado em pacientes com DRC que requerem suplementação de ferro, em contrapartida, o PA21 por não apresentar absorção de ferro, tem melhor indicação naqueles pacientes renais crônicos sem indicação de suplementação de ferro (NASTOU, 2014; NEGRI, 2015). Porém, esta nova terapia não está isenta de riscos. Recentemente, o relato de casos de pacientes que desenvolveram elevação do FGF23 após o uso de ferro parenteral como terapia de suplemento de ferro, deixa em alerta a utilização crônica de medicamentos que proporcionam elevação sérica do ferro (WOLF, 2013; BISHAY, 2017). Outro dado que deve

ser considerado é a associação do citrato férrico com o aumento da absorção de alumínio intestinal (GUPTA, 2014; NEGRI, 2015). Ambas situações podem evoluir com complicações graves, que somente em estudos de longa evolução poderam ser elucidados.

1.4.6 Sevelamer:

Sevelamer é um polímero catiônico (polialilamina-hidroclorada) livre de alumínio e cálcio e que se liga ao fósforo (BURKE, 1997). Sua estrutura é constituída por múltiplas aminas intermediadas por moléculas de carbono. Estas aminas se tornam parcialmente carregadas de prótons no intestino e interagem com moléculas de ânion fosfato através da carga e da ligação com o hidrogênio (BURKE, 1997; CHERTOW, 1997; SESSO, 2003). In vitro, 1 g de sevelamer liga a 5 mmol de fósforo em pH 7,0. Sevelamer liga-se preferencialmente a ânions trivalentes, como o fosfato e citrato. Também se liga a ácidos biliares e aminoácidos conjugados carregados negativamente, os quais como o fósforo, são abundantes no intestino durante as refeições. A ligação do sevelamer com ácidos biliares leva ao aumento da excreção fecal de ácidos biliares e reduz o LDL colesterol. Esta queda no LDL colesterol é a propriedade farmacológica primária do sevelamer e representa o efeito farmacológico adicional na redução do risco cardiovascular em pacientes com DRC (WILKES, 1998). Estudos em animais e em humanos demonstram que o sevelamer não é absorvido (BURKE, 1997; ROSENBAUM, 1997).

Vários autores têm mostrado uma diminuição de progressão da taxa de calcificação coronariana em pacientes com DRC dialítica tratados com sevelamer comparados com pacientes tratados com carbonato ou acetato de cálcio (CHERTOW, 2002; O'NEILL, 2010; KAKUTA, 2011). Em estudo realizado com o objetivo de tratar pacientes em diálise já com calcificação coronariana, o aumento da calcificação foi de 0% e 6% nas semanas 26 e 52 no grupo tratado com sevelamer comparado a 14% e 25% no mesmo período no grupo que utilizou carbonato ou acetato de cálcio. Neste estudo os níveis de fósforo sérico não diferiram ao final do estudo, entretanto, os níveis de cálcio sérico foram significativamente menores para o grupo que utilizou sevelamer (CHERTOW, 2002).

Em um estudo experimental, utilizando o sevelamer em camundongos knockout para apolipoproteína-E, os autores demonstraram a ação do sevelamer na redução tanto da placa de ateroma quanto da calcificação vascular, de forma independente dos níveis de colesterol. Tal feito possivelmente foi relacionado à sua ação no metabolismo mineral ou sobre o estresse oxidativo, ou ainda sobre ambos (PHAN, 2005).

1.4.7 Quitosana – goma de mascar:

Um grupo de pesquisadores utilizou a quitosana na formulação em goma de mascar entre as refeições, associado à terapia convencional com sevelamer no tratamento da hiperfosfatemia (SAVICA, 2009). A utilização de tal terapia foi baseada em observação de estudos anteriores que mostravam altas concentrações de fósforo na saliva de pacientes com DRC não dialítica (SAVICA, 2008) e em hemodiálise (SAVICA, 2007), podendo chegar a cinco vezes a concentração sérica. Considerando a ingestão diária de 500 a 700 mL de saliva produzida, grande parte da carga de fósforo ingerida nos períodos entre as refeições (já que os quelantes habitualmente são utilizados junto às refeições) seria o responsável, em parte, pela grande taxa de falência nos tratamentos para hiperfosfatemia (SAVICA, 2009). Neste contexto, os autores conseguiram uma redução de aproximadamente 31% dos níveis séricos de fósforo ao final de duas semanas utilizando a goma de mascar duas vezes ao dia, em períodos entre as refeições (SAVICA, 2009). Porém estudos realizados recentemente não foram capazes de reproduzirem tais achados, levando a considerar a reduzida quantidade de quitosana contida na goma de mascar (20 mg) e o fato da não randomização do estudo original, como as possíveis causas dos resultados inicialmente encontrados (BLOCK, 2013; OH, 2014).

1.5 COMPLEXO QUITOSANA FERRO INSOLÚVEL:

1.5.1 Quitina e Quitosana:

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos (AZEVEDO, 2007). Ambas as estruturas são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ entretanto os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade. Na estrutura da quitina, que é insolúvel na maioria dos solventes testados, predominam unidades de 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopiranosose enquanto que quitosana, que é predominantemente formada por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose, é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos (MATHUR, 1990; AZEVEDO, 2007).

A quitina é separada de outros componentes da carapaça de crustáceos por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteínização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico, por exemplo. A quitina obtida, o biopolímero contendo grupos acetil (NHCOCH_3), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo assim a quitosana que é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável (AZEVEDO, 2007; ODÍLIO, 2008).

A quitosana é considerada um biopolímero do tipo polissacarídeo, e possui uma estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal chamada celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. A figura 2 mostra a comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitosana, onde os grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino (NH_2) para a quitosana. É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (RAVI KUMAR, 2000).

Devido à alta densidade de cargas positivas do polímero, a quitosana atrai e se liga aos lipídeos como uma “esponja”. Em um ambiente ácido como o estômago, a quitosana adsorve as gorduras durante a digestão, formando uma esponja de gordura, de baixa digestão. No intestino, um ambiente básico, a “esponja” de gordura é solidificada e eliminada pelas fezes, sem ser absorvida pelo organismo. Além da redução da absorção intestinal de gorduras, apresenta a capacidade de modulação da leptina e proteína C reativa em modelos animais, sugerindo um papel auxiliar no tratamento da obesidade (ZHANG, 2012; WALSH, 2013). Porém, em recente metanálise seus resultados quanto a diminuição na reabsorção intestinal de gordura e redução de peso devem ser analisados com cautela em estudos com seres humanos (RIOS-HOYO, 2016).

Durante o curso de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil do polímero são rompidas com formação de unidades de D-Glicosamina que contém um grupo amínico livre. Entretanto, a quitosana não é uma unidade química uniforme, mas um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais, os que apresentam grau de desacetilação acima de 30%, já podem ser considerados como quitosana, sendo que as aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia do polímero. Industrialmente, é importante um rígido controle das condições reacionais para que se obtenha um polímero de cadeia longa e com grau de desacetilação na faixa desejada (AZEVEDO, 2007; ODÍLIO, 2008).

Outra propriedade importante da quitosana é a sua capacidade de formar complexos com vários íons metálicos, sendo, desse modo útil na quelação de ferro, cobre e manganês, possibilitando sua utilização para remover íons de metais pesados tóxicos, tais como prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo (CRAVEIRO, 1999).

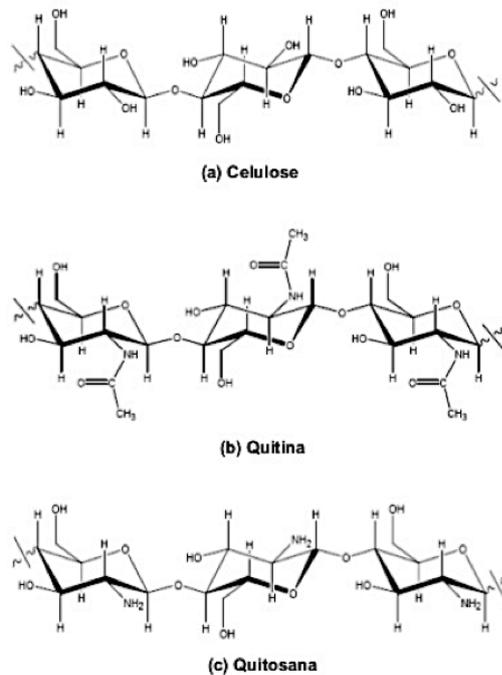


Figura 2: Comparação das estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosana. (AZEVEDO, 2007)

As aplicações e a produção industrial da quitosana experimentaram um elevado crescimento a partir da década de 70. No Japão, a produção de quitosana cresceu 37%, ao ano, entre 1978 e 1983. Atualmente, as maiores aplicações da quitosana estão centralizadas na purificação de água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos. A tendência atual, para aplicações industriais, é para produtos com alto valor tecnológico agregado, como cosméticos, agentes de liberação de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos. Ainda tem sido relatado o grande potencial da quitosana em biotecnologia, podendo ela ser utilizada na forma de flocos, gel ou membrana na imobilização de células em meios de cultura (CRAVEIRO, 1999).

Um resumo das aplicações da quitosana está contido na tabela 3.

Tabela 3 : Principais aplicações da quitina e da quitosana.

Purificação de água residual de indústrias
Estabilizantes de gorduras em preparações de alimentos
Estabilizantes de aromas
Meio de troca iônica
Aditivos de cosméticos e xampus
Absorvente na remoção de metais pesados
Proteção bactericida de sementes
Estabilizante de frutas e verduras perecíveis
Agente imobilizante de microrganismos

Fonte: CRAVEIRO, 1999.

1.5.2 Complexo Quitosana-Ferro:

A quitosana, uma vez complexada com a forma ferrosa (II) (QTS-Fe II), tem a capacidade de adsorver fósforo *in vitro*, sendo mais vantajosa quando comparada com o sulfato básico de ferro. Esses efeitos da quitosana Fe (II) podem ser atribuídos à insolubilidade devido à formação do complexo QTS-Fe II (JING, 1992).

Fagundes e Rodrigues mostraram que a quitosana complexada com o ferro (III) e passando por processo de reticulação (QTS-Fe III-R ou QTS-Fe III insolúvel), apresenta vantagens quando comparada com a QTS-Fe II, principalmente pela maior capacidade de adsorção de fosfato. Estudos estes conduzidos em soluções aquosas diluídas de fosfato (FAGUNDES, 2001).

O uso do polímero QTS-Fe III reticulada na adsorção de fosfato *in vitro* e *in vivo* foi demonstrado por Bürger et al. *In vitro*, a capacidade de adsorção do complexo foi de 23,6 mg de fosfato por grama de polímero e aproximadamente 16% do ferro se dissociou do complexo. Experimentos *in vivo* mostraram o efeito da administração do complexo em animais hiperfosfatêmicos. A redução do fosfato sérico foi de 32,7% nos animais tratados com o complexo (BÜRGER, 2001). Baxter et al. testaram também a QTS-Fe III em animais alimentados com ração enriquecida com fósforo e também obtiveram redução dos níveis séricos do mesmo (BAXTER, 2000). A baixa liberação de ferro deste composto confere uma opção para o tratamento da hiperfosfatemia em pacientes com DRC (LOGHAMAN-ADHAM, 2003). Os primeiros estudos toxicológicos utilizando o polímero QTS-Fe III solúvel durante 30 dias, demonstraram alterações em alguns parâmetros bioquímicos além de deposição de ferro em órgãos dos animais tratados (PIAZZA, 2001). Posteriormente, dando continuidade aos ensaios experimentais, o mesmo centro de pesquisa avaliou o efeito toxicológico do complexo QTS-Fe III solúvel administrado cronicamente (90 dias). Os

resultados revelaram ausência de alterações quanto: ao estado comportamental, ganho de peso, parâmetros bioquímicos e hematológicos, além de não apresentarem alterações significativas quanto à deposição de ferro nos órgãos, demonstrando a segurança do polímero (VALCARENGHI, 2006).

Mais recentemente, Schöninger avaliou os efeitos do complexo QTS-Fe III solúvel e insolúvel em um modelo experimental de diabetes mellitus. Neste experimento o autor utilizou o complexo tanto por via oral (gavagem) quanto administrado junto à ração de uso diário e concluiu que: tanto o polímero solúvel quanto o insolúvel (quando administrados oralmente) foram capazes de adsorver o fósforo, porém quando adicionado à ração somente o complexo insolúvel foi capaz de reduzir os níveis séricos de fósforo. Quanto aos níveis de ferro sérico houve estabilidade do polímero, não liberando o ferro para a circulação (SCHÖNINGER, 2007). Vale ressaltar que neste estudo o aloxano, apesar de proporcionar elevação dos níveis glicêmicos dos animais, não levou a alteração significativa da função renal.

Deste modo, apesar dos estudos apresentarem até o momento resultados que sugerem o complexo QTS-Fe III como potencial quelante de fósforo, não há estudo comprovando seu uso como tal em animais com DRC.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O DMO/DRC é complicação frequente e associada a desfechos cardiovasculares. Seu tratamento é complexo, e a terapia mais utilizada é baseada no uso de substâncias quelantes de fosfato. Existem opções de quelantes no mercado, porém com limitações em relação aos efeitos colaterais, principalmente a calcificação de tecidos moles e vascular, e ao custo elevado. O estudo de quelantes livres de cálcio, tendo como elemento quelante principal o ferro, são promissores na busca de formulações de escolha por proporcionar efeito quelante associado a menor risco de calcificação vascular, apesar de não apresentar com clareza suas interações com o FGF23 e com os achados da histologia óssea.

3 HIPÓTESES:

O polímero QTS-Fe III insolúvel tem poder adsorvente (quelante) sobre o fosfato quando administrado por via oral em ratos com DRC.

O polímero QTS-Fe III insolúvel quando administrado por via oral em ratos com DRC possui ação semelhante ao carbonato de cálcio quanto: poder quelante de fosfato e achados histológicos ósseos.

4 OBJETIVOS:

Primário:

Avaliar o efeito quelante de fosfato do polímero QTS-Fe III insolúvel administrado por via oral em ratos Wistar com DRC induzida por adenina.

Secundários:

Comparar o efeito quelante de fosfato entre QTS-Fe III insolúvel e o Carbonato de Cálcio;

Avaliar o efeito dos quelantes de fosfato: QTS-Fe III insolúvel e Carbonato de Cálcio sobre o FGF23.

Avaliar o efeito dos quelantes de fosfato: QTS-Fe III insolúvel e Carbonato de Cálcio sobre a ODR.

5 MATERIAL E MÉTODOS:

5.1 ANIMAIS:

Foram utilizados 120 ratos (*Rathus norvegicus*) da linhagem Wistar, com oito a doze semanas de idade e com pesos corporais de aproximadamente 250 gramas, obtidos da colônia do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

O alojamento dos animais no biotério do CBR-UFJF é provido de estantes climatizadas (temperatura e umidade controladas e fluxo de ar constantemente renovado). A iluminação é mista combinando luz natural e lâmpadas incandescentes, sendo estas controladas automaticamente para oferecer um fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. Tais condições estão de acordo com as diretrizes para a utilização de animais em pesquisas científicas e atividades didáticas, que visa manejar com respeito e de forma adequada a espécie, sendo as necessidades de transporte, alojamento, condições ambientais, nutrição e cuidados veterinários atendidos (RODRIGUES, 2009). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha selecionada, mamadeira para água filtrada e cocho para ração e alojados em estantes climatizadas (Alesco Indústria e comércio Ltda., Monte Mor, Brasil). A água e a ração foram oferecidas ad libitum e a temperatura ambiente mantida ao redor de 22°C, com iluminação mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – controladas automaticamente para acenderem às 6h e apagarem às 18h.

Os procedimentos necessários para a realização do trabalho estão de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008 e com a regulamentação do Conselho Nacional do Controle Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme protocolo nº 031/2013.

A DRC foi induzida através da adição da adenina a 0,75% durante quatro semanas (fase de indução da DRC) seguida de 0,1% por mais três semanas (fase de manutenção da DRC). A ração foi produzida em um único lote (PragSoluções S.A., Jaú, SP, Brasil), com formulação descrita no quadro abaixo:

Proteína bruta	22,0 %	Matéria Mineral	8,0 %
Extrato etéreo	4,0 %	Cálcio	0,7 %
Fibra bruta	6,0 %	Fósforo	1,0 %

Fonte: PragSoluções Biociências, 2011

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

Os animais foram randomicamente divididos em 05 grupos (figura 3):

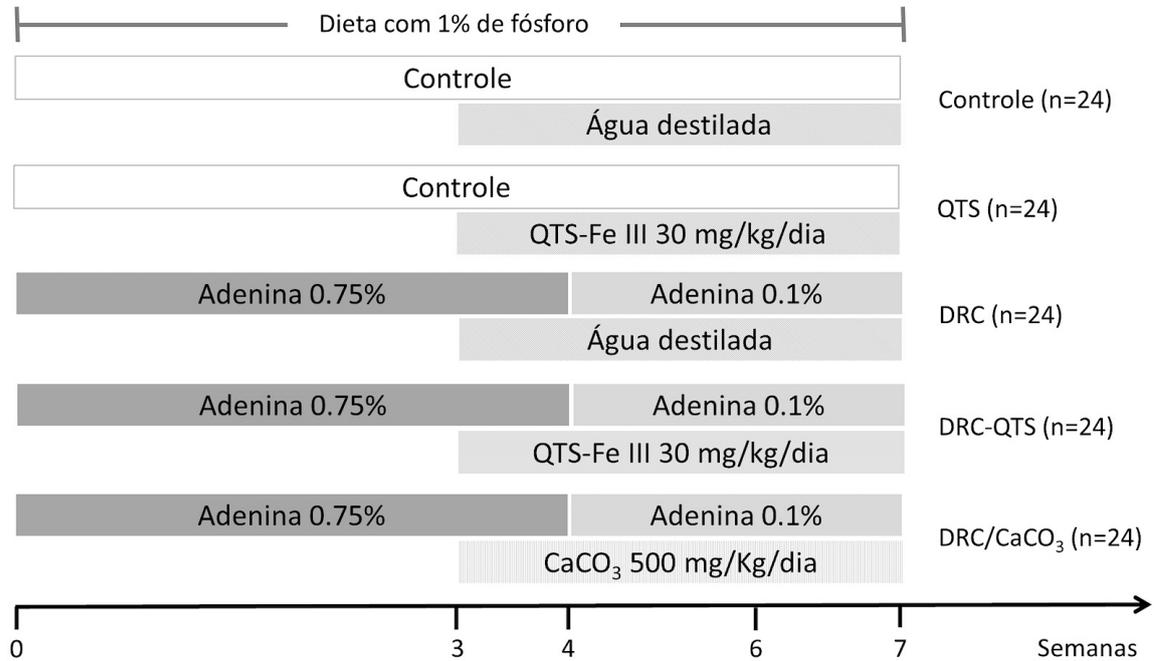


Figura 3: desenho do estudo (QTS: Quitosana; DRC: Doença Renal Crônica; CaCO₃: Carbonato de Cálcio).

CONTROLE (n=24): Os ratos receberam ração padrão e nenhum tipo de tratamento, somente receberam 1ml/150g de água destilada a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais após a quarta, sexta e sétima semanas.

QTS (n=24): Neste grupo, os animais receberam ração padrão e foram tratados com QTS-Fe(III) insolúvel a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais após a quarta, sexta e sétima semanas.

DRC (n=24): Os animais foram submetidos à indução da DRC conforme descrito e não foram tratados, somente receberam 1ml/100g de água destilada a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais após a quarta, sexta e sétima semanas.

DRC-QTS (n=24): Neste grupo os animais foram submetidos à indução da DRC conforme descrito e foram tratados com QTS-Fe(III) insolúvel a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais após a quarta, sexta e sétima semanas.

DRC-CaCO₃ (n=24): Neste grupo os animais foram submetidos à indução da DRC conforme descrito e foram tratados com CaCO₃ a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais após a quarta, sexta e sétima semanas.

As eutanásias foram realizadas nas semanas 4, 6 e 7 com o objetivo de acompanhar e comprovar a evolução da DRC e suas consequências metabólicas.

Durante o experimento foram avaliados semanalmente o consumo de ração e as medidas de peso.

Foram realizadas aplicações intraperitoneais de oxitetraciclina (Terramicina®; Pfizer Animal Health, Nova Iorque, NY, EUA) na dose de 30 mg/kg nos dias 11^o, 12^o e 4^o, 5^o, respectivamente, que antecederam a data da eutanásia. A administração de oxitetraciclina foi utilizada para marcação óssea e análise de formação óssea.

No dia anterior às eutanásias, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, onde foi mensurado o volume total de diurese através da coleta de urina durante 24 horas. Antes da coleta de sangue os animais foram pesados e anestesiados com a associação de xilazina (König S.A, Avellaneda, Argentina) na dose de 10mg/kg e cetamina (König S.A, Avellaneda, Argentina) na dose de 90mg/kg, aplicados por via intraperitoneal. Foi realizada punção cardíaca para obtenção de sangue e em seguida os animais foram eutanasiados por ruptura do diafragma (WOLFENSOHN; LLOYD, 1994).

As amostras de urina foram centrifugadas à 3.000rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA). O sangue também foi centrifugado sob as mesmas condições para separação do soro. Ambas as amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos sob refrigeração a -80°C em ultra freezer vertical (Thermo Scientific, Suwanee, EUA) e posteriormente analisado. Uma amostra de sangue foi destinada ao hemograma completo.

Os fêmures esquerdos foram retirados e fixados inicialmente em álcool a 70% para posterior processamento, como descrito a diante.

5.3 TRATAMENTO COM QUELANTES DE FOSFATO:

A administração dos quelantes de fosfato foi iniciada após a terceira semana de experimento conforme desenho do estudo (figura 4), uma vez ao dia por via intragástrica. Os animais dos grupos CONTROLE e DRC receberam diariamente 1mL de água destilada para cada 100 g de peso.

5.3.1 Polímero QTS-Fe III insolúvel:

O polímero Quitosana ferro III insolúvel foi preparado de acordo com o método descrito na literatura por Fagundes et al (FAGUNDES, 2001) e Bürger et al (BÜRGER, 2001), proveniente da quitosana comercial (Quitosana Purifarma ®).

A quitosana comercial foi dissolvida em uma solução aquosa de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0,1 M por 4 horas, resultando um precipitado de cor laranja depois da adição de acetona. O sólido foi filtrado e lavado com acetona para remover o excesso de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ e finalmente secado à vácuo. Após o preparo, foi determinada a quantidade de ferro espectrofotometricamente utilizando a 1,10-fenantrolina como agente cromóforo (FAGUNDES, 2001).

A reação de reticulação da QTS-Fe III solúvel, tornando-a insolúvel, foi realizada através da agitação de uma solução de glutaraldeído 15% (15 mL de glutaraldeído com 85 mL de acetona) com o polímero por um período de 12 horas. Posteriormente, o sólido foi separado através de filtração a vácuo e lavado com acetona e água destilada para remoção do excesso de glutaraldeído, garantindo a insolubilidade do material preparado em água ou ácido (FAGUNDES, 2001).

Todo o procedimento de obtenção do polímero foi realizado no Laboratório de Química da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, Itajai, SC, Brasil).

A concentração de Ferro neste polímero foi de 80 mg de ferro/g de polímero. A droga foi suspensa em água destilada, na concentração de 5mg/ml, e administrada na dose de 30mg/kg/dia (SCHÖNINGER, 2007).

5.3.2 Carbonato de cálcio:

De acordo com o desenho do estudo, o grupo de animais que utilizaram o Carbonato de cálcio (Os-cal®, 500 mg/comp, Sanofi, São Paulo, SP, Brasil), receberam a droga na dose de 500mg/Kg/dia pelo método de gavagem. O comprimido foi triturado e suspenso em água destilada, na concentração de 60mg/mL.

5.4 PARÂMETROS AVALIADOS

5.4.1 Peso

A avaliação das alterações de peso dos animais foi realizada registrando-se o peso (g), em balança analítica (Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, Brasil), de cada animal uma vez por semana.

5.4.2 Avaliações no soro e urina

Foram realizados os testes para dosagens de creatinina sérica e urinária (Creatinina K), fósforo sérico e urinário (Fósforo UV Liquiform), cálcio sérico total (Cálcio Liquiform), ferro sérico (Fe Liquiform) e fosfatase alcalina (Fosfatase alcalina Liquiform) (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil). O equipamento utilizado para tais análises foi o analisador automático Labmax Progress (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil).

Além disso, foram realizadas as dosagens de PTH (Rat Intact PTH ELISA Kit, Immutopics, San Clement, EUA) e FGF-23 (FGF-23 ELISA Kit, Cloud-Clone Corp., Houston, EUA) no soro dos animais pela técnica de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Uma amostra de 1mL de sangue total de cada animal foi coletada em tubos contendo EDTA 1% e processada imediatamente após a coleta avaliando os seguintes parâmetros: hematimetria, hematócrito, hemoglobina. O hemograma foi processado em aparelho contador automático Poch100ivDiff (Sysmex, Kobe, Japão).

5.4.3 Função renal

A função renal foi avaliada pela depuração da creatinina (Clcr), calculada pela diferença entre o produto da creatinina urinária e o fluxo urinário de 24 horas, divididos pelo valor da creatinina sérica. Os valores do Clcr foram expressos em ml/min:

$$\text{Clcr} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dl)} \times \text{fluxo urinário (ml/min)}}{\text{creatinina sérica (mg/dl)}}$$

5.4.4 Eficiência quelante

A eficiência do quelante foi mensurada pelas dosagens de fósforo sérico e pela estimativa da fração de excreção urinária de fósforo (FeP).

A FeP foi estimada pela seguinte fórmula:

$$\text{FeP}\% = \frac{(\text{fósforo urinário (mg/dL)} \times \text{creatinina sérica (mg/dL)}) \times 100}{\text{fosforo sérico (mg/dL)} \times \text{creatinina urinária (mg/dL)}}$$

5.4.5 Histomorfometria óssea

Os fêmures esquerdos extraídos foram submetidos ao processamento como descrito a seguir (GOUVEIA, 1997):

A. Fixação, desidratação e penetração pela resina:

Os fragmentos foram fixados em etanol 70% e processados conforme as seguintes etapas:

Permanência no etanol a 70% por 6 dias

Permanência no etanol a 100% por 6 dias

Permanência no tolueno por 2 dias

Permanência na solução A (metilmetacrilato 75% + dibutilftalato 25%) por 7 dias

Permanência na solução A + peróxido de benzoíla a 1% por 7 dias

Permanência na solução A + peróxido de benzoíla a 2% por 7 dias

B. Inclusão:

A inclusão foi feita numa "pré-base", ou seja num frasco de 20 ml com tampa, com cerca de 5 ml de Solução 2 % já polimerizada (esta solução polimeriza em estufa à 37 °C). O material foi adicionado nesta "pré-base" a seguir, complementado com mais Solução 2 %. O endurecimento do bloco ocorreu após 48 h na estufa a 37°C.

C. Preparação do bloco:

O frasco de 20 ml onde foi feita a inclusão, serviu somente como molde. Com auxílio de uma serra o bloco foi moldado em uma forma retangular. A seguir foi lixado e identificado, estando pronto para microtomia.

D. Microtomia

De cada bloco foram obtidos 12 cortes histológicos de 5 μm distribuídos em 6 lâminas com dois cortes em cada uma, corados com Azul de Toluidina 0,1% (pH 6,4) para análise histológica. Foram obtidos também 2 cortes histológicos de 10 μm , distribuídos em 2 lâminas, com um corte em cada uma, não corados, para análise das marcações pela tetraciclina, empregando-se uma fonte de luz ultravioleta. Todos os cortes foram obtidos em micrótomo de impacto JUNG Policut S (Leika, Heidelberg, Alemanha) e com navalha de tungstênio.

5.4.5.1 Análise do tecido ósseo

Os parâmetros estruturais, estáticos e dinâmicos de formação e reabsorção óssea foram analisados na metáfise distal (ampliação 250x) a 195 μm da cartilagem de crescimento, num total de 30 campos, usando um analisador de imagem semi-automático (Osteometas, Osteometrics, Atlanta, GA, EUA).

Os parâmetros estruturais incluíram:

Volume trabecular (BV/TV, %), que é volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas;

Número de trabéculas (Tb.N, μm): número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido;

Espessura trabecular (Tb.Th, μm): espessura das trabéculas ósseas.

Os índices de formação óssea incluíram:

Espessura osteóide (O.Th, μm): espessura do osso não mineralizado (osteóide);

Superfície osteóide (OS/BS, %): porcentagem da superfície trabecular total recoberta por matriz osteóide;

Superfície osteoblástica (Ob.S/BS, %): porcentagem da superfície trabecular total que apresenta osteoblastos;

Superfície de mineralizante (MS/BS, %): porcentagem da superfície trabecular que apresenta dupla marcação pela tetraciclina;

Taxa de aposição mineral (MAR, $\mu\text{m}/\text{dia}$): distância média de 4 medidas entre as 2 marcações com tetraciclina, dividida pelo intervalo de tempo entre a administração das duas doses de tetraciclina.

Utilizando a relação (MAR x MS/BS) foi calculada a taxa de formação óssea (BFR/BS, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$): volume de osso novo mineralizado, formado por unidade de superfície trabecular e por unidade de tempo.

Os índices de reabsorção óssea incluíram:

Superfície de reabsorção (ES/BS, %): porcentagem da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção com a presença ou não de osteoclastos;

Superfície osteoclástica (Oc.S/BS, %): porcentagem da superfície trabecular total que apresenta osteoclastos.

Os índices histomorfométricos foram apresentados segundo a nomenclatura recomendada pela American Society of Bone and Mineral Research-ASBMR (DEMPSTER, 2013).

As análises foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica – 16 (LIM/16) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados são apresentados como média \pm DP ou mediana (min-máx). As comparações entre os grupos foram feitas utilizando o teste-t para dois grupos e Anova (post-hoc Bonferroni) para mais de dois grupos, quando estes apresentavam distribuição normal. E Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis para mais de dois grupos, quando apresentavam distribuição não normal. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes. Utilizamos o programa IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc., Chicago, USA) para todas as análises.

6 RESULTADOS:

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos.

- Artigo 1: Chitosan-Fe (III) complex as a phosphate chelator in uremic rats: a novel treatment option.

Submetido e aceito para publicação na revista: Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology.

- Artigo 2: Ação de quelante a base de ferro sobre o FGF23 e a doença óssea em ratos urêmicos.

Resultados parciais foram apresentados nos seguintes eventos:

XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia – 2014:

Poster:

Novo quelante de fósforo e sua ação na calcificação vascular em um modelo experimental de doença renal crônica – Estudo piloto

Modelo experimental de uremia com calcificação vascular por adição de adenina e alto teor de fósforo na dieta.

11º Congresso Mineiro de Nefrologia - 2015:

Poster:

Caracterização laboratorial do distúrbio mineral-ósseo em modelo animal de Doença Renal Crônica.

XXVIII Congresso Brasileiro de Nefrologia – 2016:

Poster:

Radiografia digital na avaliação da densidade óssea em ratos urêmicos.

12ª Congresso Mineiro de Nefrologia – 2017:

Apresentação oral:

Ação de quelante a base de ferro sobre o FGF23 e doença óssea em ratos urêmicos.

6.1 Artigo 1:

Chitosan-Fe (III) complex as a phosphate chelator in uremic rats: a novel treatment option

Abstract

Phosphate retention and hyperphosphatemia are associated with increased mortality in chronic kidney disease (CKD) patients. We tested the CH-FeCl as a potential phosphate chelator in rats with CKD. We evaluated 96 animals, divided equally into 4 groups (control, CKD, CH-FeCl and CKD/CH-FeCl), over 7 weeks. We induced CKD by feeding animals with an adenine-enriched diet (0.75% in the first 4 weeks and 0.1% in the following 3 weeks). We administered 30mg/kg daily of the test polymer, by gavage, from the third week until the end of the study. All animals received a diet supplemented with 1% phosphorus. Uremia was confirmed by the increase in serum creatinine in week 4 (36.24 ± 18.56 vs 144.98 ± 22.1 mmol/L; $p=0.0001$) and week 7 (41.55 ± 22.1 vs 83.98 ± 18.56 mmol/L; $p=0.001$) in CKD animals. Rats from the CKD group treated with CH-FeCl had a 54.5% reduction in serum phosphate (6.10 ± 2.23 vs 2.78 ± 0.55 mg/dL) compared to a reduction of 25.6% in the untreated CKD group (4.75 ± 1.45 vs 3.52 ± 0.74 mmol/L, $p=0.021$), between week 4 and week 7. At week 7, renal function in both CKD groups was similar (serum creatinine: 83.98 ± 18.56 vs 83.10 ± 23.87 mmol/L, $p = 0.888$), but CH-FeCl-treated rats had a reduction in phosphate overload measured by fraction phosphate excretion (FEPi) (0.71 ± 0.2 vs 0.4 ± 0.16 , $p = 0.006$) compared to the untreated CKD group. Our study demonstrated that CH-FeCl had an efficient chelating action on phosphate.

Introduction

Approximately 70% of patients with chronic kidney disease (CKD) have impaired phosphorus metabolism, which contributes to high cardiovascular mortality in this population [1, 2]. As kidney dysfunction progresses and renal phosphate excretion is affected, fractional excretion of phosphate (FEPi) and fibroblast growth factor 23 (FGF23) increase at early phases of CKD and phosphatemia and parathyroid hormone (PTH) at advanced stages, which are recognized as the most commonly associated changes in bone–mineral disorder associated with CKD (CKD-MBD) [3-6]. Current treatment aims to reduce the phosphate overload through diet restriction and the use of substances with phosphate chelating power in the intestinal tract [4, 7]. Calcium-based phosphate chelators, although widely used, have been

progressively replaced by non-calcium chelators, such as sevelamer and lanthanum, due to their increased risk of vascular calcification [8-13]. Recently, the emergence of new options, such as iron-based chelators, i.e. ferric citrate and succroferric oxidation (PA21), increase the treatment options for CKD-MBD [14-17].

A new insoluble complex of chitosan and iron (III) chloride, the cross-linked iron chitosan III (CH-FeCl), has been investigated as a possible chelator while taking advantage of the adsorption power of chitosan. CH-FeCl combines the chelator properties of chitosan and iron, without the risk of iron availability and consequent intestinal intolerance and toxicity. This compound has been shown to reduce phosphate absorption in the intestine of diabetic rats with hyperphosphatemia induced by diet phosphorus overload [18 - 20]. In these studies, however, animals did not have CKD nor CKD-MBD, which limits their potential for clinical usefulness.

Our study aimed to evaluate the power of the CH-FeCl complex as a phosphate chelator in an experimental model of CKD with confirmed loss of renal function, that mimics phosphate retention and hyperphosphatemia secondary to CKD in humans.

Materials and methods

Animals. We used 8 to 12-week Wistar rats, weighing approximately 250 g, from a colony at the Center for Reproductive Biology of Universidade Federal de Juiz de Fora. Animals were housed in climate-controlled shelves at 22°C, in a 12h light/12h darkness cycle. Water and food pellets were available ad libitum. These housing conditions and experimental procedures follow Brazilian federal regulations (Brazilian Federal Law 11,794, October 08, 2008, and the directives of the Brazilian Council on Animal Testing Control – CONCEA), as well as Directive 86/609/EEC, (the 1986 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used For Experimental and other Scientific Purposes), and the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adopted by the American Society of Toxicology in 1989. The experiments were carried out after protocol approval by the Universidade Federal de Juiz de Fora Ethics Committee for Animal Research (031/2013, CEUA-UFJF).

Preparation of the CH-FeCl complex. Chitosan (240 kD, Purifarma, São Paulo, SP, Brazil) was dissolved in a 0.1M Fe(NO₃)₃ aqueous solution (Vetec, Rio de Janeiro, SP, Brazil) over 4 hours, then precipitated with acetone, resulting in an orange precipitate, which was filtered and washed with acetone to remove excess Fe(NO₃)₃, and vacuum-dried. This product was then added to a 15% glutaraldehyde solution in acetone (Merck, Cotia, SP, Brazil) for 24h,

filtered and washed with water to remove the excess of glutaraldehyde. The resulting polymer was characterized according to the literature [21]. The iron content was 80 mg/g, as determined by the spectrophotometric method using 1,10-phenanthroline as a complexing agent and a Shimadzu UV1600 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The entire procedure was carried out at the Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) Chemistry Laboratory.

Experimental model and design. After a week of acclimatization, 96 rats were divided into 4 groups: control, CH-FeCl, CKD, and CKD/CH-FeCl. Uremia was induced in the CKD and CKD/CH-FeCl groups (n = 48 animals) by feeding the animals with an adenine-enriched diet (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP). We included 0.75% adenine in the diet until week 4 to induce CKD [22, 23]. In the next 3 weeks, we used 0.1% adenine to maintain CKD, as previously described [24]. We added the maintenance phase [24] to the original protocol of 0.75% adenine for 4 weeks [22,23] to prevent renal function recovery that some animals may present, according to a pilot study (data not shown), and to better mimic of CKD-MBD [24]. The control and CH-FeCl groups (n=48 animals) were fed a standard diet (Pragsoluções Biosciências, Jaú, Brazil) over the entire 7 weeks of the experiment. All diets were enriched in phosphorus (1% total phosphorus). Body weight and food intake were measured weekly. Eight animals from each group were euthanized at the fourth, sixth and seventh weeks to monitor disease progression. On the previous day, animals were kept in metabolic cages and urine was collected for 24 hours. Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of 10 mg/kg xylazine and 90 mg/kg ketamine (König SA, Avellaneda, Argentina), and blood samples were obtained by heart puncture, without evidence of significant hemolysis, followed by diaphragm rupture [25].

Urine samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes in a refrigerated centrifuge (Sorvall, Suwanee, GA, USA). Blood was also centrifuged under the same conditions to obtain the serum. Both types of samples were then stored in cryogenic tubes at -80°C (Thermo Scientific, Suwanee, GA, USA) until further analysis.

CH-FeCl: CH-FeCl was administered daily by gavage from the third week until the end of the study at a dosage of 30 mg/kg daily [19], whereas animals in the control and CKD groups received gavage with a 0.9% physiological solution over the same period.

Biochemical analysis and renal function. Levels of serum and urinary creatinine, serum and urinary phosphate, total serum calcium and total serum iron were measured with a Labmax Progress automatic analyzer (Labtest Diagnostica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil).

Statistical analysis. Data normality was assessed by the Shapiro-Wilk test and is presented as mean \pm standard deviation. Comparison between group was performed with the Student's t-test, whereas comparisons of more than two groups used analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni test. The difference was considered significant when $p < 0.05$. All analyses were carried out using the IBM SPSS Statistics 21 program (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Of the initial group of 96 animals, four died during the study: one from the CKD group during the third week, one from the CH-FeCl group during the fourth week and two from the CH-FeCl group during the sixth week. Weight, food intake and the biochemical parameters analyzed were not affected by the use of CH-FeCl during the treatment period (Figure 1 and Table 1).

After the introduction of adenine in the diet, we observed weight loss in the animals and significant changes in biochemical parameters. In the CKD group, there was a reduction in renal function, measured by increased creatinine levels at week 4 (144.98 ± 22.1 vs 36.24 ± 18.56 mmol/L, $p=0.0001$) and week 7 (83.98 ± 18.56 vs 41.55 ± 22.1 mmol/L; $p=0.001$) compared to the control group. The urinary volume also increased (54.2 ± 7.0 vs. 15.4 ± 8.9 mL/24 h, $p=0.0001$) from the week 4 to week 7 (Figures 1 and 2, Table 1).

The CKD group had higher serum creatinine ($p=0.001$), phosphate ($p=0.001$), calcium ($p=0.02$) and FEPi ($p=0.0001$) values than the control group by week 7 (Table 1).

Conversely, when we evaluated serum phosphate variation between week 4 and week 7 in the CKD/CH-FeCl group, we observed a significant decline of 54.5% in serum phosphate in this group (6.10 ± 2.23 vs 2.78 ± 0.55 mg/dL) compared to the untreated CKD group, which presented a 25.6 % reduction ($p = 0.021$, 4.75 ± 1.45 vs 3.52 ± 0.74 mmol/L) (Figure 3).

We observed that the CKD group treated with CH-FeCl had significantly lower FEPi values (0.71 ± 0.20 vs 0.40 ± 0.16 , $p = 0.006$) compared to the CKD group at week 7, but there were no significant differences in renal function between the two groups (creatinine serum: 83.98 ± 18.56 vs. 83.10 ± 23.87 mmol / L, $p = 0.888$) (Table 1).

There was no difference in total serum iron values between groups at week 7 (Table 1).

Discussion

Loss of renal function leads to a progressive retention of certain electrolytes, such as phosphate. When the glomerular filtration rate is below 20 mL.min⁻¹/1.73 m², kidneys increase the rate of urinary phosphate excretion, indicated by the FEPi, in order to maintain the serum phosphate balance [26]. Thus, substances that chelate intestinal phosphate, by reducing its absorption and bioavailability, lead to a subsequent reduction in the excretion of urinary phosphate and FEPi [27, 28]. Although calcium-based chelators are often used in hyperphosphatemia therapy, mainly due to their greater availability and lower cost than non-calcium chelators, their association with high serum calcium levels and the risk of metastatic calcification warrants the development of calcium-free chelators. On the other hand, the available non-calcium compounds, such as sevelamer and lanthanum carbonate, also have limitations due their high costs and absence of proved safety in long-term use [29,30]. In our study, we demonstrated that the CH-FeCl polymer, a calcium-free, low-cost and non-absorbable compound, significantly reduced the levels of serum phosphate in rats with CKD induced by an adenine-enriched diet.

The drug used in our study is an association of cross-linked chitosan and Fe (III). The cross-linking process with glutaraldehyde renders the polymer insoluble at the acidic pH in the stomach, preventing the release of iron [20], which, as a transition metal, can establish a strong link to phosphate. The phosphate-chelating capacity of this non-absorbable polymer was demonstrated in previous animal and in-vitro studies, with a serum phosphate reduction of 20-40%, without promoting changes in serum iron levels [17-20]. However, although these animals presented elevated phosphate levels, they did not develop CKD, contrary to the animals in our study.

Our experimental model reproduced CKD phase 4, as classified by the National Kidney Foundation [31], with tubulointerstitial involvement, as indicated by polyuria (Figure 2). Anemia was present in animals with CKD, but serum iron levels did not change with the introduction of the chelator, demonstrating the non-absorption of iron in the intestine.

The use of phosphate chelators is common and necessary in patients with dialytic CKD, as diet and dialysis alone are insufficient to control hyperphosphatemia. However, the capacity of these compounds to reduce phosphatemia is variable, with studies demonstrating a reduction in phosphate between 20 to 50%. It is also known that, in addition to the efficacy of the compound, the adherence of patients to the use of phosphate chelators may vary, making maintaining phosphate homeostasis a constant challenge [32-37]. Recently, iron-based drugs have been shown to promote greater reduction of serum phosphate levels than previously used

chelators without causing calcium overload, making this class of drugs the target of studies to evaluate the impact on mortality in CKD patients [38,39]. In the last week of our study, animals with CKD treated with CH-FeCl had 19% lower serum phosphate values than untreated CKD animals (Table 1). This difference has been considered relevant in clinical studies, as it shows an association with improvement in mineral/bone disorder markers, possibly reducing the risk of vascular calcification [14, 36, 37, 40, 41]. Furthermore, animals with CKD treated with CH-FeCl also showed a significant 43% reduction in FEPi compared to untreated CKD animals, indicating a reduction in kidney phosphate overload consistent with lower phosphate intestinal absorption and thus, an effective phosphate chelator activity (Table 1). At that point, it is noteworthy that the two groups presented similar levels of renal dysfunction.

The dose CH-FeCl complex used in this study, sufficient to produce a phosphate-chelating effect, was equivalent to approximately 2 g/day for a person with 70 kg. This is half the usual dose for other chelators, such as sevelamer, calcium carbonate or acetate, bixalomer and even PA21, to reduce phosphatemia [33, 34, 38]. This data is of great importance when evaluating the treatment of patients with chronic conditions, as the possibility of reducing the dose or number of daily pills or tablets can increase adherence to treatment and better quality of life for patients with CKD [42,43]. However, the results obtained with this dose need to be confirmed in larger studies in humans.

Although our study had a longitudinal design, the variables evaluated were not collected through repeated measures in the same individual. Thus, measurements performed in the studied groups at different times are subject to a potential interference from heterogeneity between groups throughout follow-up. The partial recovery of renal function observed in CKD animals, even after the modification in the original model of CKD by introducing adenine overload and the severe bone disease induced by this model, led to phosphate and calcium removal from the bone. This may explain the difference between serum phosphate in CKD and CKD/CH-FeCl groups was clinically, but not statistically, significant.

In conclusion, we showed that treatment with a low dose of the CH-FeCl polymer had an effective phosphate chelator action by reducing intestinal phosphate absorption in uremic rats. It would be interesting to test this compound in studies with humans to investigate its efficacy, safety and impact on the mortality of patients with CKD.

Acknowledgments:

Wander Barros do Carmo was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisas em Nefrologia (IMEPEN). This study was carried out at the Universidade Federal de Juiz de Fora (Federal University of Juiz de Fora, UFJF), Juiz de Fora, MG, Brazil.

Conflict of Interest:

The authors declare no conflict of interest related to this study.

References:

- Levey AS, Inker LA, Coresh, J. GFR Estimation: From Physiology to Public Health. *Am J Kidney Dis* 2014;63:820-34.
- Fraser SD, Roderick PJ, May CR, McIntyre N, McIntyre N, Fluck RJ, et al. The burden of comorbidity in people with chronic kidney disease stage 3: a cohort study. *BMC Nephrology* 2015;16:doi10.1186/s12.882-015-0189-z.
- Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007;71:31-8.
- (KDIGO) Kidney Disease: Improving Global Outcomes, CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009;113:S1-S130.
- Block GA, Ix JH, Ketteler M, Martin KJ, Thadhani RI, Tonelli M, et al. Phosphate homeostasis in CKD: report of a scientific symposium sponsored by the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 2013;62:457-73.
- Abramowitz M, Muntner P, Coco M, Southern W, Lotwin I, Hostetter TH, et al. Serum alkaline phosphatase and phosphate and risk of mortality and hospitalization. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1064-71.
- Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Selinger SL, Shilipak MG, Jenny NS, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:381-7.
- Malberti F. Hyperphosphataemia: treatment options. *Drugs* 2013;73:673-88.
- Kalaitzidis RG, Elisaf MS. Hyperphosphatemia and phosphate binders: effectiveness and safety. *Curr Med Res Opin* 2014;30:109-12.

- Frazão JM, Adragão T. Non-calcium-containing phosphate binders: comparing efficacy, safety, and other clinical effects. *Nephrol Clin Pract* 2012;120:108-19.
- Goldsmith D, Covic A. Oral phosphate binders in CKD - is calcium the (only) answer? *Clin Nephrol* 2014;81:389-95.
- Wang C, Liu X, Zhou Y, Li S, Chen Y, Wang Y, et al. New conclusions regarding comparison of sevelamer and calcium-based phosphate binders in coronary-artery calcification for dialysis patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Plos One* 2015;10:doi:10.1371/journal.pone.0133938.
- Kakuta T, Tanaka R, Hyodo T, Suzuki H, Kanai G, Nagaoka M, et al. Effect of sevelamer and calcium-based phosphate binders on coronary artery calcification and accumulation of circulating advanced glycation end products in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2011;57:422-31.
- Block GA, Fishbane S, Rodriguez M, Smits G, Shermesh S, Pergola PE, et al. A 12-week, double-blind, placebo-controlled trial of ferric citrate for the treatment of iron deficiency anemia and reduction of serum phosphate in patients with CKD Stages 3-5. *Am J Kidney Dis* 2015;65:728-36.
- Lewis JB, Sika M, Kory MJ, Chuang P, Schulman G, Smith MT, et al. Ferric citrate controls phosphorus and delivers iron in patients on dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:493-503.
- Yagil Y, Fadem SZ, Kant KS, Bhatt U, Sika M, Lewis JB, et al. Managing hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease on dialysis with ferric citrate: latest evidence and clinical usefulness. *Ther Adv Chronic Dis* 2015;6:252-63.
- Negri AL, Ureña Torres PA. Iron-based phosphate binders: do they offer advantages over currently available phosphate binders? *Clin Kidney J* 2015;8:161-7.
- Baxter J, Shimizu F, Takiguchi Y, Wada M, Yamaguchi T. Effect of iron(III) chitosan intake on the reduction of serum phosphorus in rats. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:863-74.
- Bürger C, Valcarenghi D, Sandri S, Rodrigues CA. Cross-linking chitosan-Fe(III), an oral phosphate binder: studies in vitro and in vivo. *Int J Pharm* 2001;223:29-33.
- Schöninger LM, Dall'Oglio RC, Sandri S, Rodrigues CA, Bürger C. Chitosan iron(III) reduces phosphorus levels in alloxan diabetes-induced rats with signs of renal failure development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;106:467-71.
- Fagundes T, Bernardi EL, Rodrigues CA. Phosphate adsorption on chitosan-Fe(III)-crosslinking: batch and column studies. *J Liq Chrom Rel Technol* 2001;24:1189-98.
- Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 1986;44:230-4.

- Terai K, Mizukami K, Okada M. Comparison of chronic renal failure rats and modification of the preparation protocol as a hyperphosphataemia model. *Nephrol* 2008;13:139-46.
- Damment S, Secker R, Shen V, Lorenzo V, Rodriguez M. Long-term treatment with lanthanum carbonate reduces mineral and bone abnormalities in rats with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1803-12.
- Jones-Bolin S. Guidelines for the care and use of laboratory animals in biomedical research. *Curr Protoc Pharmacol* 2012;doi:10.1002/0471141755.pha04bs59.
- Anderson S, Meyer TW. Pathophysiology and nephron adaptation in chronic renal failure. In: Schrier RW, Gottschalk CW. *Diseases of the kidney*. Little Brown and Company New York 1997;2555-79.
- Rosenbaum DP, Holmes-Farley SR, Mandeville WH, Pitruzzello M, Goldberg DI. Effect of Renagel®, a non-absorbable, cross-linked, polymeric phosphate binder, on urinary phosphorus excretion in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:961-4.
- Pennick M, Poole L, Dennis K, Smyth M. Lanthanum carbonate reduces urine phosphorus excretion: evidence of high-capacity phosphate binding. *Renal Failure* 2012;34:263-70.
- Shigematsu T, Ohya M, Negi S, Masumoto AR, Nakashima YM, Iwatani Y, et al. Safety and efficacy evaluation of lanthanum carbonate for hyperphosphatemia in end-stage renal disease patients. *Contrib Nephrol* 2015;185:42-55.
- Hutchison AJ, Wilson RJ, Garafola S, Copley JB. Lanthanum carbonate: safety data after 10 years. *Nephrology* 2016;21:987-94.
- Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011;80:17-28.
- Yusuf AA, Howell BL, Powers CA, St Peter WL. Utilization and cost of medication associated with CKD mineral and bone disorder in dialysis patients enrolled in Medicare Part D. *Am J Kidney Dis* 2014;64:770-80.
- Bleyer AJ, Burke SK, Dillon M, Garrett B, Kant KS, Lynch D, et al. A comparison of the calcium-free phosphate binder sevelamer hydrochloride with calcium acetate in the treatment of hyperphosphatemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999;33:694-701.
- Akizawa T, Origasa H, Kameoka C, Kaneko Y, Kanoh H. Dose-finding study of bixalomer in patients with chronic kidney disease on hemodialysis with hyperphosphatemia: a double-blind, randomized, placebo-controlled and sevelamer hydrochloride-controlled open-label, parallel group study. *Ther Apher Dial* 2014;Suppl2:24-32.

- Van Buren PN, Lewis JB, Dwyer JP, Greene T, Middleton J, Sika M, et al. The phosphate binder ferric citrate and mineral metabolism and inflammatory markers in maintenance dialysis patients: results from prespecified analyses of a randomized clinical trial. *Am J Kidney Dis* 2015;66:479-88.
- Koiwa F, Terao A. Dose-response efficacy and safety of PA21 in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia: a randomized, placebo-controlled, double-blind, Phase II study. *Clin Exp Nephrol* 2016; [in press].
- Floege J, Covic AC, Ketteler M, Mann JF, Rastogi A, Spinowitz B, et al. Long-term effects of the iron-based phosphate binder, sucroferric oxyhydroxide, in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:1037-46.
- Palmer SC, Gardner S, Tonelli M, Mavridis D, Johnson DW, Craig JC, et al. Phosphate-binding agents in adults with CKD: a network meta-analysis of randomized trials. *Am J Kidney Dis* 2016;[in press].
- Yaguchi A, Yonekubo S, Maruyama I, Tatemichi S, Maruyama K, Kobayashi M. Comparison of phosphate binding capacities of PA21, a novel phosphate binder, with those of other phosphate binders in vitro and in vivo. *Drug Res (Stuttg)* 2016;66:262-9.
- Navaneethan SD, Palmer SC, Craig JC, Elder GJ, Strippoli GF. Benefits and harms of phosphate binders in CKD: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis* 2009;54:619-37.
- Liu L, Wang Y, Chen H, Zhu X, Zhou L, Yang Y. The effects of non-calcium phosphate binders versus calcium-based phosphate binders on cardiovascular calcification and bone remodeling among dialysis patients: a meta-analysis of randomized trials. *Ren Fail* 2014;36:1244-52.
- Chiu YW, Teitelbaum I, Misra M, de Leon EM, Adzize T, Mehrotra R. Pill burden, adherence, hyperphosphatemia, and quality of life in maintenance dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1089-96.
- Wang S, Alfieri T, Ramakrishnan K, Braunhofer P, Newsome BA. Serum phosphorus levels and pill burden are inversely associated with adherence in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:2092-9.

Figures

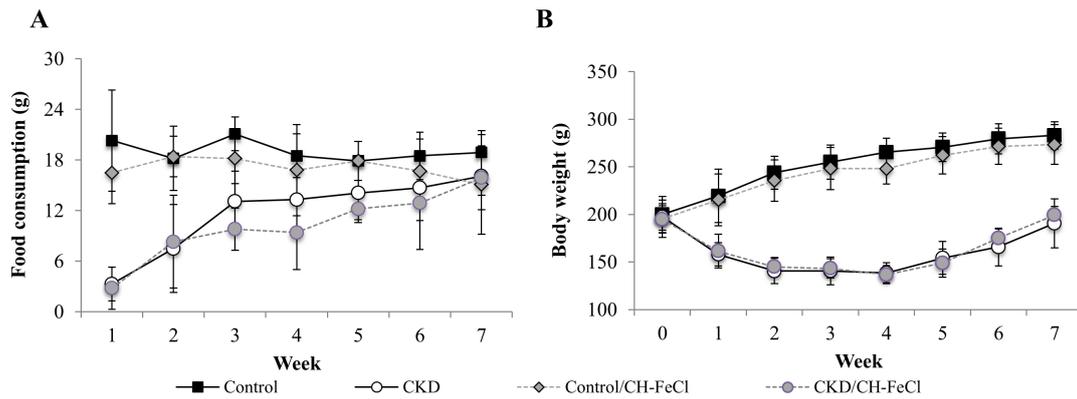


Figure 1. Food intake (A) and body weight (B). Treatment with complex cross-linked chitosan iron(III) (CH-FeCl) did not affect any of these parameters, both in animals in the chronic kidney disease (CKD) and control groups. In CKD groups (with or without CH-FeCl), there was a reduction in weight gain and food intake until week 4, when animals were fed with a 0.75% adenine diet. After week 4, with the reduction of adenine concentration to 0.1%, food intake and weight gain were recovered compared to the control groups. Twenty-four animals were studied in each group, and 8 animals from each group were euthanized at weeks 4, 6 and 7. Values are expressed as mean \pm SD.

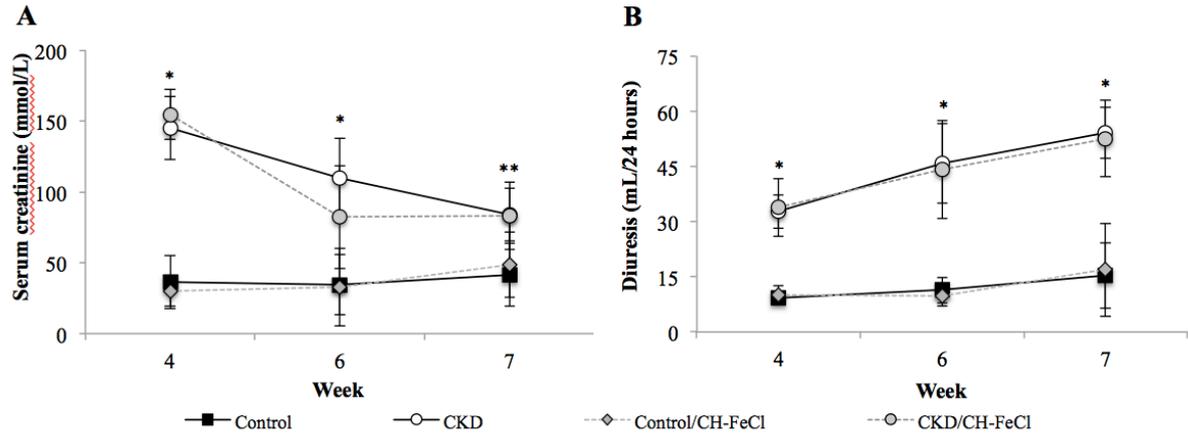
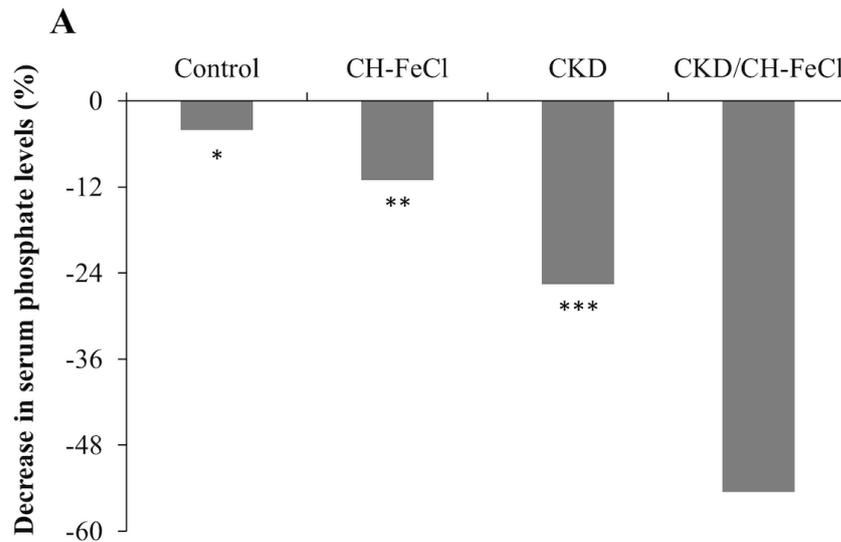


Figure 2. Serum creatinine (A) and diuresis (B). Animals in the CKD groups presented lower renal function (higher serum creatinine) and greater diuresis compared to those in the control groups. The diet of the animals with CKD was enriched with 0.75% of adenine until week 4 and 0.1% of adenine between weeks 4 and 7. Groups were composed of 24 animals, and 8 animals from each group were euthanized at weeks 4, 6 and 7. CH-FeCl - Complex cross-linked chitosan iron (III); CKD – chronic kidney disease. Values are expressed as mean \pm SD. (*CKD and CKD/CH-FeCl groups vs Control and Control/CH-FeCl groups; $p < 0.0001$. ** CKD vs Control, $p = 0.001$; CKD vs Control/CHFeCl, $p = 0.005$; CKD vs CKD/CH-FeCl, $p = 0.888$).



B

Serum phosphate (mmol/L)	Control (n=8)	CH-FeCl (n=8)	CKD (n=8)	CKD/CH-FeCl (n=8)
Week 4	2.29 ± 0.23	2.45 ± 0.1	4.75 ± 1.45	6.10 ± 2.23
End of treatment	2.20 ± 0.16	2.20 ± 0.13	3.52 ± 0.74	2.78 ± 0.55
Change from week 4 to end of treatment	-0.10 ± 0.16	-0.26 ± 0.19	-1.23 ± 1.45	-3.33 ± 1.84

Figure 3. Variation of serum phosphate levels. A: Proportion of decrease in the levels of serum phosphate between week 4 and week 7. * $p=0.0001$; ** $p=0.001$; *** $p=0.021$ compared to the CKD/CH-FeCl group. B: Variation of mean serum phosphate levels during the study between all groups. Values are indicated as mean \pm SD, statistical significance $p<0.05$. Control: animals fed standard diet and treated with placebo; CH-FeCl: Animals fed a standard diet and treated with cross-linked iron chitosan III (CH-FeCl); CKD: Animals with diet-induced CKD, treated with placebo; CKD/CH-FeCl: Animals with diet-induced CKD, treated with cross-linked iron chitosan III.

Table 1. Haemoglobin and biochemical data: Laboratory parameters of all groups the week 7.

Parameter	Control (n=8)	Control/CH -FeCl (n=8)	CKD (n=8)	CKD/CH- FeCl (n=8)	p*	p**	p***
Serum creatinine (mmol/L)	41.55 ± 22.1	48.62 ± 22.98	83.98 ± 18.56	83.10 ± 23.87	0.517	0.001	0.888
Phosphate (mmol/L)	2.20 ± 0.16	2.20 ± 0.13	3.52 ± 0.74	2.78 ± 0.55	0.366	0.001	0.091
Total serum calcium (mmol/L)	2.10 ± 0.27	2.14 ± 0.30	2.60 ± 0.46	2.58 ± 0.30	0.775	0.02	0.913
Fraction excretion of phosphorus	0.20 ± 0.16	0.18 ± 0.13	0.71 ± 0.20	0.40 ± 0.16	0.858	0.0001	0.006
Haemoglobin (g/dL)	14.66 ± 0.89	15.00 ± 0.59	10.01 ± 0.71	9.86 ± 1.68	0.391	0.0001	0.821
Total serum iron (mmol/L)	37.05 ± 4.98	40.42 ± 6.02	54.59 ± 29.49	47.74 ± 12.15	0.321	0.383	0.683

Values are expressed as mean ± SD, Student's t-test, statistical significance $p < 0.05$. CKD – chronic kidney disease; CH-FeCl - Complex cross-linked chitosan iron(III); * Control vs Control/CH-FeCl; ** Control vs CKD; *** CKD vs CKD/CH-FeCl.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed US National Library of Medicine National Institutes of Health

Format: Abstract - Send to -

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2017 Jul 20. doi: 10.1111/bcpt.12849. [Epub ahead of print]

Chitosan-Fe (III) Complex as a Phosphate Chelator in Uraemic Rats: A Novel Treatment Option.

do Carmo WB^{1,2,3}, Castro BBA^{2,3}, Rodrigues CA⁴, Custódio MR⁵, Sanders-Pinheiro H^{2,3,6}.

Author information

Abstract

Phosphate retention and hyperphosphataemia are associated with increased mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). We tested the use of cross-linked iron chitosan III (CH-FeCl) as a potential phosphate chelator in rats with CKD. We evaluated 96 animals, divided equally into four groups (control, CKD, CH-FeCl and CKD/CH-FeCl), over 7 weeks. We induced CKD by feeding animals an adenine-enriched diet (0.75% in the first 4 weeks and 0.1% in the following 3 weeks). We administered 30 mg/kg daily of the test polymer, by gavage, from the third week until the end of the study. All animals received a diet supplemented with 1% phosphorus. Uraemia was confirmed by the increase in serum creatinine in week 4 (36.24 ± 18.56 versus 144.98 ± 22.1 $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.0001$) and week 7 (41.55 ± 22.1 versus 83.98 ± 18.56 $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.001$) in CKD animals. Rats from the CKD group treated with CH-FeCl had a 54.5% reduction in serum phosphate (6.10 ± 2.23 versus 2.78 ± 0.55 mmol/L) compared to a reduction of 25.6% in the untreated CKD group (4.75 ± 1.45 versus 3.52 ± 0.74 mmol/L , $p = 0.021$), between week 4 and week 7. At week 7, renal function in both CKD groups was similar (serum creatinine: 83.98 ± 18.56 versus 83.10 ± 23.87 $\mu\text{mol/L}$, $p = 0.888$); however, the CH-FeCl-treated rats had a reduction in phosphate overload measured by fractional phosphate excretion (FEPI) (0.71 ± 0.2 versus 0.4 ± 0.16 , $p = 0.006$) compared to the untreated CKD group. Our study demonstrated that CH-FeCl had an efficient chelating action on phosphate.

© 2017 Nordic Association for the Publication of BCPT (former Nordic Pharmacological Society).

PMID: 28727296 DOI: 10.1111/bcpt.12849

LinkOut - more resources

Full text links: Wiley Online Library

Save Items: Add to Favorites

Similar articles: Chitosan Iron(III) reduces phosphorus levels in alloxan diabetic; Effect of iron(III) chitosan intake on the reduction of serum phosphorus; Renal calcium, phosphorus, magnesium and uric acid handling: comparator

Review: Hyperphosphataemia: treatment options; Dietary interventions for mineral and bone disorder

See reviews... See all...

Related information: MedGen

6.2 Artigo 2

Ação de quelante a base de ferro sobre o FGF23 e a doença óssea em ratos urêmicos.

Resumo

Introdução: O uso de ferro (Fe) endovenoso (ev) pode associar-se a alterações no FGF23 e ósseas, conforme a função renal residual e a solução de Fe ev utilizado. **Objetivo:** Avaliar o efeito de quelante de fósforo a base de Fe sobre o FGF23 e o metabolismo ósseo em ratos urêmicos. **Metodologia:** 32 animais foram divididos em 4 grupos: controle, doença renal crônica (DRC), complexo quitosana-ferro III/DRC (DRC/CH-FeCl) e carbonato de cálcio/DRC (CaCO₃/DRC). A DRC foi induzida através de dieta com adenina a 0,75% (4 semanas) e a 0,1% (3 semanas). Os quelantes foram administrados da 3^a a 7^a semana. Animais foram submetidos a eutanásia na semana 7, para coleta de sangue (creatinina, cálcio, fósforo, FGF23), urina (creatinina, fósforo) e fêmur. **Resultados:** O grupo DRC apresentou elevação significativa da creatinina em relação ao controle ($0,47 \pm 0,25$ vs $0,95 \pm 0,21$ mg/dl; $p=0,001$), hiperfosfatemia ($6,82 \pm 0,52$ vs $10,6 \pm 2,49$ mg/dl; $p=0,001$), elevação da fração excretada de fósforo (FeP) ($0,2 \pm 0,17$ vs $0,71 \pm 0,2$; $p=0,0001$) e do FGF23 ($7,42 \pm 1,96$ vs $81,36 \pm 37,16$ pg/ml; $p=0,011$). O uso dos quelantes proporcionou redução expressiva da FeP (Controle: $0,71 \pm 0,20$; DRC/CH-FeCl: $0,40 \pm 0,16$; CaCO₃/DRC: $0,34 \pm 0,15$; $p=0,001$), sem alteração do FGF23. A histomorfometria mostrou uma doença óssea de alta remodelação nos animais urêmicos que não foi alterada com o uso dos quelantes. **Conclusão:** O quelante a base de Fe reduziu a sobrecarga de fosfato, sem acarretar alterações no nível sérico do FGF23 ou doença ossea de baixa remodelação quando comparado ao quelante carbonato de cálcio.

Introdução:

A perda progressiva da função renal leva a complicações metabólicas importantes como a retenção de fosfato, resultando em longo prazo no distúrbio mineral/ósseo da doença renal crônica (DMO/DRC), que por sua vez tem um papel fundamental no aumento da mortalidade cardiovascular dos pacientes urêmicos (1) (2) (3) (4).

Drogas capazes de reduzir a absorção intestinal do fósforo são utilizadas na grande maioria dos pacientes com DRC, e na atualidade as opções de quelantes de fosfato isentos de cálcio vem crescendo (5) (6). No passado, o hidróxido de alumínio foi utilizado como quelante, porém devido ao seu potencial efeito tóxico ao sistema nervoso central

(encefalopatia por alumínio) e ao osso (osteomalácia induzida pelo alumínio), fez com que praticamente caísse em desuso (7) (8).

Quelantes a base de ferro estão sendo lançados como uma possível opção terapêutica para redução dos níveis de fosfato sérico, sem o potencial risco das complicações relacionadas à sobrecarga de cálcio (9) (10) (11). Porém, em recentes publicações, a suplementação de ferro tanto em estudos clínicos quanto experimentais demonstrou interação entre o ferro administrado e o metabolismo do FGF23, que ainda não está totalmente elucidada (12) (13) (14) (15). Dependendo da via de administração, da função renal e da necessidade ou não de terapia renal substitutiva, o elemento ferro poderia induzir elevação ou redução dos níveis séricos do FGF23 com consequências drásticas ao metabolismo ósseo, como a indução de uma doença óssea de baixa remodelação, representada pela osteomalácia (16) (17) (18) (19) (20) (21).

O quelante do fosfato CH-FeCl, é um polímero reticulado de quitosana que tem como fator que potencializa seu efeito o elemento ferro na forma férrica (Fe^{3+}). Tal complexo, quando utilizado por via oral em baixas doses em ratos com função renal normal e com DRC, demonstrou efeito quelante sem proporcionar depósito de Fe nos órgãos destes animais. Estes dados revelam sua eficácia e segurança, apesar de nestes estudos não ter ocorrido uma avaliação de sua ação sobre a morfologia óssea (22) (23) (24) (25).

Diante do fato, temos como objetivo neste estudo avaliar o efeito do complexo quitosana-Ferro III reticulado (CH-FeCl) sobre o metabolismo e morfologia ósseas em ratos, com uremia induzida pela adenina.

Métodos

Foram seguidas todas as diretrizes internacionais, nacionais e institucionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão em conformidade com a lei federal brasileira 11.794 de 8 de outubro de 2008, de acordo com o Conselho Nacional Brasileiro de Controle de Experimentação Animal, e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais de Experimentação da Universidade Federal de Juiz de Fora, de acordo com o protocolo (031/2013, CEUA-UFJF).

Protocolo experimental:

Utilizamos 32 ratos Wistar de 8 a 12 semanas, pesando aproximadamente 250 g, da colônia no Centro de Biologia Reprodutiva da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os

animais foram alojados em prateleiras climatizadas a temperatura de 22 ° C e em um ciclo de 12/12h de luz/escuro. Todos os animais foram alimentados com uma dieta em pellets contendo 0,7% de cálcio, 1,0% de fosfato e 22,0% de proteína (PragSoluções Biociências, Jaú, Brasil). A água e o alimento estavam disponíveis ad libitum. Após uma semana de aclimação, os animais foram divididos em 4 grupos com animais cada: controle, DRC, DRC/CH-FeCl e DRC/Carbonato de cálcio (DRC/CaCO₃). A Uremia foi induzida nos grupos DRC, DRC/CH-FeCl e DRC CaCO₃ (n = 24 animais) alimentando os animais com uma dieta enriquecida com adenina (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP). Foi adicionado 0,75% de adenina na dieta até a semana 4 para induzir DRC, e mantido 0,1% até o final do estudo, totalizando 7 semanas de acompanhamento. Os animais do grupo com função renal normal (grupo controle; n= 08 animais) foram alimentados com uma dieta padrão (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP), por um período igual de 7 semanas. O peso corporal e a ingestão de alimentos foram medidos semanalmente (figura 1).

Para avaliação dos parâmetros dinâmicos da formação óssea utilizamos oxitetraciclina (Terramicina®; Pfizer Animal Health, Nova Iorque, NY, EUA), via intraperitoneal, na dose de 30 mg/kg como um marcador fluorescente do osso, nos dias 37, 38, 44 e 45 do protocolo. No dia anterior a eutanásia, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada em um período de 24 horas, para avaliação do volume urinário e análises bioquímicas. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de xilazina e 90 mg/kg de cetamina (König SA, Avellaneda, Argentina), e amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, seguida de ruptura do diafragma. As amostras de soro e urina coletadas foram armazenadas a - 80°C para avaliação bioquímica posterior. Os fêmures foram removidos para histomorfometria óssea.

O CH-FeCl foi administrado diariamente por gavagem a partir da terceira semana até o final do estudo com uma dosagem de 30 mg/kg/dia, assim como o CaCO₃ na dose de 500 mg/Kg/dia, enquanto que os animais no grupos DRC receberam, também por gavagem, solução salina 0,9% durante o mesmo período.

Preparação do complexo CH-FeCl.

A quitosana (240 kD, Purifarma, São Paulo, SP, Brasil) foi dissolvida em uma solução aquosa de Fe(NO₃)₃ a 0,1M (Vetec, Rio de Janeiro, SP, Brasil) durante 4 horas, e precipitada com acetona, resultando em precipitado de cor laranja, que foi filtrado e lavado com acetona para remover o excesso de Fe(NO₃)₃ e seco a vácuo. Este produto foi então adicionado a uma solução de glutaraldeído a 15% de acetona (Merck, Cotia, SP, Brasil) por

24h, filtrado e lavado com água para remover o excesso de glutaraldeído. O polímero resultante foi caracterizado de acordo com a literatura (26). O teor de ferro foi de 80 mg/g, conforme determinado pelo método espectrofotométrico utilizando 1,10-fenantrolina como agente complexante e um espectrofotômetro Shimadzu UV1600 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Química da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil).

Parâmetros avaliados:

Análise bioquímica: Os níveis de creatinina sérica e urinária, fosfato sérico e urinário, cálcio sérico total e ferro sérico total foram medidos com um analisador automático Labmax Progress (Labtest Diagnostica S.A., Lagoa Santa, MG). Os valores de PTH foram determinados pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (Rat Intact PTH ELISA Kit, Immotopics, San Clemente, CA, EUA), assim como o nível de FGF23 (FGF-23 ELISA Kit, Cloud-Clone Corp., Houston, EUA).

Histomorfometria óssea: O fêmur direito de cada animal foi removido, dissecado e separado do tecido mole, imerso em etanol a 70% e processado como descrito anteriormente (27). Usando um microtomo Polycut S equipado com uma lâmina de carboneto de tungstênio (Leika, Heidelberg, Alemanha), os fêmures foram cortados distalmente em seções de 5 μm e 10 μm de espessura. As seções de 5 μm foram coradas com azul de toluidina a 0,1% (pH 6,4), e examinadas pelo menos duas seções não consecutivas por amostra. As seções de 10 μm não foram coradas, e foram utilizadas para análise das marcações pela tetraciclina, empregando-se uma fonte de luz ultravioleta.

Os parâmetros estruturais, estáticos e dinâmicos de formação e reabsorção óssea foram analisados na metafise distal (ampliação 250x) a 195 μm da cartilagem de crescimento, num total de 30 campos, usando um analisador de imagem semi-automático (Osteometas, Osteometrics, Atlanta, GA, EUA).

Os parâmetros estruturais incluíram: volume trabecular (BV/TV, %), que é volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas; número de trabéculas (Tb.N, μm): número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido; espessura trabecular (Tb.Th, μm): espessura das trabéculas ósseas.

Os índices de formação óssea: espessura osteóide (O.Th, μm): espessura do osso não mineralizado (osteóide); superfície osteóide (OS/BS, %): porcentagem da superfície

trabecular total recoberta por matriz osteóide; superfície osteoblástica (Ob.S/BS, %): porcentagem da superfície trabecular total que apresenta osteoblastos; superfície de mineralizante (MS/BS, %): porcentagem da superfície trabecular que apresenta dupla marcação pela tetraciclina; taxa de aposição mineral (MAR, $\mu\text{m}/\text{dia}$): distância média de 4 medidas entre as 2 marcações com tetraciclina, dividida pelo intervalo de tempo entre a administração das duas doses de tetraciclina. A partir dessas medidas, utilizando a relação (MAR x MS/BS) foi calculada a taxa de formação óssea (BFR/BS, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$): volume de osso novo mineralizado, formado por unidade de superfície trabecular e por unidade de tempo.

Os índices de reabsorção óssea: superfície de reabsorção (ES/BS, %): porcentagem da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção com a presença ou não de osteoclastos; superfície osteoclástica (Oc.S/BS, %): porcentagem da superfície trabecular total que apresenta osteoclastos.

Os índices histomorfométricos foram apresentados segundo a nomenclatura recomendada pela American Society of Bone and Mineral Research-ASBMR (28).

As análises foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica – 16 (LIM/16) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm DP ou mediana (min-máx). As comparações entre os grupos foram feitas utilizando o teste-t para dois grupos e Anova (post-hoc Bonferroni) para mais de dois grupos, quando estes apresentavam distribuição normal. E Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis para mais de dois grupos, quando apresentavam distribuição não normal. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes. Utilizamos o programa IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc., Chicago, USA) para todas as análises.

Resultados:

Foram utilizados 32 animais no experimento não sendo registrada mortalidade nos grupos estudados durante o período de observação. O peso e o consumo de ração não foram afetados pelo uso do CH-FeCl durante o tratamento.

Parâmetros bioquímicos

A função renal foi significativamente menor nos grupos com DRC induzida pela adenina como demonstrado pelos maiores valores da creatinina sérica em relação ao grupo controle ao final do estudo ($0,95 \pm 0,21$ vs $0,47 \pm 0,25$ mg/dL; $p=0,001$). No grupo com DRC a elevação da creatinina foi associada à hiperfosfatemia ($10,60 \pm 2,48$ vs $6,82 \pm 0,52$ mg/dL; $p=0,001$) (Tabela 1).

A utilização dos quelantes CH-FeCl e CaCO₃, por gavagem, foi capaz de reduzir a fosfatemia, apesar da diferença entre os grupos tratados e o grupo DRC não ser significativa. Por outro lado a fração excretada de fósforo (FeP) nos grupos DRC/CH-FeCl e DRC/CaCO₃ foi menor em relação ao grupo DRC (DRC: $0,71 \pm 0,2$; DRC/CH-FeCl: $0,40 \pm 0,16$; DRC/CaCO₃: $0,34 \pm 0,15$; $p=0,001$). Ao final do estudo os níveis séricos do cálcio total foram mais elevados nos grupos com DRC, não sofrendo influência pelo tratamento quelante realizado.

Os valores da fosfatase alcalina e do FGF23 elevaram-se no grupo DRC quando comparado ao grupo controle e mantiveram-se elevados mesmo nos grupos tratados. O PTH apesar de mostrar valores elevados com o desenvolvimento da DRC, não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Os valores da hemoglobina em todos os grupos com DRC foram significativamente menores em relação ao grupo controle, caracterizando anemia secundária à DRC. Por outro lado, os valores do ferro sérico não diferiram entre os grupos estudados (Tabela 1).

Morfometria óssea

A histomorfometria óssea foi realizada em cinco animais de cada grupo. Em dois animais do grupo de DRC houve sobreposição das marcações com oxitetraciclina, comprometendo as leituras dos parâmetros dinâmicos. Assim, consideramos 3 animais para a avaliação dos parâmetros dinâmicos de formação óssea no grupo DRC.

Os parâmetros ósseos estruturais não apresentaram diferenças entre os grupos. Ao avaliarmos os parâmetros de formação e de reabsorção óssea, observamos diferenças entre os grupos Controle e DRC, configurando um padrão de doença óssea de alta remodelação para o grupo DRC com valores elevados para Espessura Osteóide (O.Th), Superfície Osteóide (OS/BS), Superfície Osteoblástica (Ob.S/BS), Taxa de Aposição Mineral (MAR), Taxa de Formação Óssea (BFR/BS), Superfície Erosada (ES/BS) e Superfície Osteoclástica (Oc.S/BS). A utilização dos quelantes não alterou os valores dos parâmetros citados, exceto

para a redução da O.Th no grupo DRC/CaCO₃ que foi significativa quando comparado aos grupos DRC e DRC/CH-FeCl (Tabela 2).

Discussão:

Após a indução da DRC através da ração enriquecida com adenina, os animais apresentaram elevação dos níveis séricos do FGF23 e também doença óssea de alta remodelação, reproduzindo as alterações clínicas do DMO/DRC como esperado. Porém, nos grupos tratados com os quelantes CH-FeCl e CaCO₃, não observamos efeito sobre os níveis séricos do FGF23 e da histomorfometria óssea, mostrando que neste modelo os tratamentos com os quelantes não influenciaram no metabolismo do FGF23.

Atualmente o Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) define o DMO/DRC como uma síndrome que engloba as alterações clínicas, bioquímicas e ósseas (29). Apesar dos marcadores bioquímicos isolados não serem capazes de diagnosticar o DMO/DRC, na prática clínica são utilizados de rotina, e contribuem para o diagnóstico do hiperparatireoidismo secundário a DRC (HPTS). Porém, há de se considerar que a relação anteriormente utilizada entre elevados valores do PTH e o diagnóstico de doença óssea de alta remodelação deve ser vista com cautela, já que tal relação está mais evidente em estágios mais avançados da DRC, podendo inclusive coexistir doença óssea de baixa remodelação com PTH elevado (30) (31) (32). Deste modo, a biópsia óssea continua como padrão ouro no diagnóstico do DMO/DRC sugerido na avaliação laboratorial inicial. No presente estudo, pudemos observar que os animais com DRC apresentaram padrão bioquímico sugestivo de HPTS, com valores elevados de fosfato, fosfatase alcalina e FGF 23, quando comparado ao grupo controle. O nível de PTH, apesar de elevado no grupo com DRC não foi significativo, provavelmente devido a grande variabilidade dos valores. Após a utilização dos quelantes, os parâmetros não foram alterados, exceto pela redução da FeP, demonstrando a ação quelante do complexo sem interferência nos outros marcadores bioquímicos do DMO/DRC no período avaliado.

Recentemente, o ferro foi descrito como potencial modulador do metabolismo do FGF23 (33). Estudos em animais e humanos demonstram que a deficiência de ferro estimula a produção do FGF23 pelos osteócitos que por sua vez é contrabalançada pela clivagem proporcionalmente aumentada do FGF23 sintetizado pelos osteócitos saudáveis, mantendo assim o equilíbrio entre produção e atividade biológica (34) (35). Na DRC, com a progressão da doença, ocorre uma aumento proporcionalmente maior dos níveis totais de FGF23 em

relação aos fragmentos c-terminais (cFGF23), provavelmente devido a interferência negativa da DRC sobre a clivagem do FGF23, gerando assim uma atividade biológica aumentada (36) (37). Por outro lado, as consequências da terapia de reposição de ferro sobre o comportamento do FGF23 necessita de maiores esclarecimentos. Até o momento, estudos realizados em pacientes com DRC mostram resultados conflitantes, onde a concentração do FGF23 intacto (iFGF23) e a fração cFGF23 foram variáveis (38) (39) (40). No entanto, na população sem DRC crescem os relatos de casos de osteomalácia, com elevação dos níveis do FGF23 após a terapia crônica de reposição endovenosa de ferro (18) (41) (42) (43) (44). A formulação do composto utilizado na ferroterapia, pode justificar em parte as discrepâncias relacionadas aos níveis do FGF23 (12). Estudos realizados com a carboximaltose férrica endovenosa, mostraram que além de induzir a redução da transcrição do FGF23, este composto proporcionou simultaneamente redução da degradação do FGF23, tanto nos osteócitos quanto periféricamente, gerando assim maior concentração do iFGF23 (12) (45). Em relação ao uso do ferro como quelante do fosfato, o óxido hidróxido suco férrico (PA21) está sendo utilizado como uma nova opção, apresentando-se com poder quelante de fosfato semelhante ao lantânio, sevelamer e carbonato de cálcio, além de algumas peculiaridades em relação a estes: necessidade de menor dose diária, capacidade de redução dos níveis séricos do FGF23, além de redução de calcificação vascular demonstrada em estudos experimentais (46) (47) (48). Em nosso estudo, os animais com DRC apresentaram valores semelhantes do ferro sérico quando comparados ao grupo controle, não havendo alterações significativas após a introdução dos quelantes. Isto demonstra a estabilidade da molécula do CH-FeCl, que mesmo contendo ferro em sua estrutura não interferiu nos níveis do ferro sérico, além de apresentar efeito quelante de fosfato e não proporcionar mudança significativa nos níveis do FGF23, correspondendo a achados semelhantes ao CaCO₃ já descritos na literatura (49) (50).

Do ponto de vista da histomorfometria óssea, os animais com DRC apresentaram valores aumentados de tecido não mineralizado (osteóide), que é uma das características histológicas da osteomalácia (51) (52). No entanto, enquanto na osteomalácia, o aumento do tecido osteóide é acompanhado por diminuição de osteoblastos, osteoclastos, taxa de aposição mineral e taxa de formação óssea, no presente estudo, todos esses parâmetros estiveram aumentados, sugerindo uma doença óssea de alta remodelação. Provavelmente o modelo experimental de DRC induzida pela adenina influenciou no metabolismo ósseo impedindo os osteoblastos de aumentar a taxa de mineralização da matriz orgânica depositada. Esta interferência na mineralização pode ter ocorrido devido a maior perda de fosfato na urina ou pela influência da adenosina, derivada da adenina, em inibir a atividade de mineralização dos

osteoblastos (53) (54). A mesma análise histomorfométrica foi realizada nos animais com DRC que utilizaram os quelantes e não demonstrou alterações nos parâmetros analisados. Com isto podemos concluir que o CH-FeCl não induziu doença óssea de baixa remodelação neste experimento, uma vez que o tratamento com os quelantes não reduziu o número de osteoblastos e osteoclastos e nem mesmo a taxa de formação óssea.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. O calcitriol é um importante marcador do DMO/DRC sofrendo interferência direta do metabolismo do FGF23 e participa da fisiopatologia da osteomalacia, porém não foi dosado. A ocorrência do comprometimento da análise dos parâmetros dinâmicos da histomorfometria óssea em dois animais do grupo DRC, também podem levar a um comprometimento da análise dos grupos que já possuíam um número limitado de animais. O tempo de experimento pode ser considerado curto quando se propõem a estudar fenômenos relacionados a DMO/DRC que normalmente surgem após períodos mais longos de DRC. Além disso, a não dosagem da ferritina e a não coloração para ferro no osso podem deixar dúvidas sobre a baixa absorção intestinal do elemento ferro do complexo CH-FeCl, apesar de já comprovada em outros estudos experimentais já citados. Apesar das limitações citadas, nosso estudo foi capaz de demonstrar um comportamento neutro do CH-FeCl em relação aos metabolismos ósseo e do FGF23.

Em conclusão, o tratamento com o CH-FeCl em ratos com DRC induzida pela adenina e alimentados com uma dieta rica em fosfato, foi capaz de reduzir a absorção intestinal de fosfato sem elevar o nível sérico de ferro, não influenciando os valores do FGF23 e sem induzir uma doença óssea de baixa remodelação como a osteomalácia, quando comparado ao carbonato de cálcio.

Referências

1. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney International*. 2007 January: p. 31-38.
2. Naves-Díaz M, Passlick-Deetjen J, Guinsburg A, Marelli C, Fernández-Martín JL, Rodríguez-Puyol D, et al. Calcium, phosphorus, PTH and death rates in large sample of dialysis patients from Latin America. The CORES Study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011 June: p. 1938-1947.
3. Górriz JL, Molina P, Bover J, Barril G, Martín-de-Francisco ÁL, Caravaca F, et al. Characteristics of bone mineral metabolism in patients with stage 3-5 chronic kidney

- disease not on dialysis: results of the OSERCE study. *Nefrologia*. 2013 November: p. 46-60.
4. Craver L, Marco MP, Martinez MP, Rue M, Borràs M, Martín ML, et al. Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5 --achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2007 April: p. 1171-1176.
 5. Elder GJ, Center J. The role of calcium and non calcium-based phosphate binders in chronic kidney disease. *Nephrology*. 2017 March: p. 42-46.
 6. Sekercioglu N, Veroniki AA, Thabane L, Busse JW, Akhtar-Danesh N, Iorio A, et al. Effects of different phosphate lowering strategies in patients with CKD on laboratory outcomes: A systematic review and NMA. *PLoS ONE*. 2017 March: p. 1-26.
 7. Wills MR, Savory J. Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia. *The Lancet*. 1983 July: p. 29-34.
 8. Malluche HH, Monier-Faugere MC. Risk of adynamic bone disease in dialyzed patients. *Kidney International*. 1992 October: p. S62-S67.
 9. Nastou D, Fernández-Fernández B, Elewa U, González-Espinoza L, González-Parra E, Sanchez-Niño MD, et al. Next-generation phosphate binders: Focus on Iron-based binders. *Drugs*. 2014 June: p. 863-877.
 10. Koiwa F, Terao A. Dose-response efficacy and safety of PA21 in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia: a randomized, placebo-controlled, double-blind, Phase II study. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2017 June: p. 513-522.
 11. Yaguchi A, Tatemichi S, Takeda H, Kobayashi M. PA21, a novel phosphate binder, improves renal osteodystrophy in rats with chronic renal failure. *PLoS One*. 2017 July: p. 1-10.
 12. Wolf M, Koch TA, Bregman DB. Effects of iron deficiency anemia and its treatment on Fibroblast Growth Factor 23 and phosphate homeostasis in women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013 August: p. 1793-1803.
 13. Lewerin C, Ljunggren O, Nilsson-Ehle H, Karlsson MK, Herlitz H, Lorentzon M, et al. Low serum iron is associated with high serum intact FGF23 in elderly men: The Swedish MrOS study. *Bone*. 2017 May: p. 1-8.
 14. Tsai MH, Leu JG, Fang YW, Liou HH. High fibroblast growth factor 23 levels associated with low hemoglobin levels in patients with chronic kidney disease stages 3 and 4. *Medicine*. 2016 March: p. 1-9.

15. Hanudel MR, Chua K, Rappaport M, Gabayan V, Valore E, Goltzman D, et al. Effects of dietary iron intake and chronic kidney disease on fibroblast growth factor 23 metabolism in wild-type and hepcidin knockout mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2016 December: p. 1369-1377.
16. Roberts MA, Huang L, Lee D, MacGinley R, Troster SMA, Kent AB, et al. Effects of intravenous iron on fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hemodialysis patients: a randomized controlled trial. *BMC Nephrology*. 2016 Nov: p. 1-11.
17. Zoller H, Schaefer B, Glodny B. Iron-induced hypophosphatemia: an emerging complication. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2017 July: p. 266-275.
18. Bishay RH, Ganda K, Seibel MJ. Long-term iron polymaltose infusions associated with hypophosphatemic osteomalacia: a report of two cases and review of the literature. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2017 January: p. 14-19.
19. Tan SJ, Satake S, Smith ER, Toussaint ND, Hewitson TD, Holt SG. Parenteral iron polymaltose changes i:c-terminal FGF23 ratios in iron deficiency, but not in dialysis patients. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2017 February: p. 180-184.
20. Iguchi A, Kazama JJ, Yamamoto S, Yoshita K, Watanabe Y, Iino N, et al. Administration of ferric citrate hydrate decreases circulating FGF23 levels independently of serum phosphate levels hemodialysis patients with iron deficiency. *Nephron*. 2015 November: p. 161-166.
21. Yokoyama K, Hirakata H, Akiba T, Fukagawa M, Nakayama M, Sawada K, et al. Ferric citrate hydrate for the treatment of hyperphosphatemia in nondialysis-dependent CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014 March: p. 543-552.
22. Baxter J, Shimizu F, Takiguchi Y, Wada M, Yamaguchi T. Effect of iron(III) chitosan intake on the reduction of serum phosphorus in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2000 Jul: p. 863-74.
23. Bürger C, Valcarenghi D, Sandri S, Rodrigues CA. Cross-linking chitosan-Fe(III), an oral phosphate binder: studies in vitro and in vivo. *Int J Pharm*. 2001 Jul 31: p. 29-33.
24. Schöninger LM, Dall'Oglio RC, Sandri S, Rodrigues CA, Bürger C. Chitosan iron(III) reduces phosphorus levels in alloxan diabetes-induced rats with signs of renal failure development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010 Jun: p. 467-71.
25. do Carmo WB, Castro BBA, Rodrigues CA, Custódio MR, Sanders-Pinheiro H. Chitosan-Fe (III) complex as a phosphate chelator in uraemic rats: a novel treatment option. *Basic*

- & *Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2017 July: p. 1-6.
26. Fagundes T, Bernardi EL, Rodrigues CA. Phosphate adsorption on chitosan-Fe(III)-crosslinking: batch and column studies. *J Liq Chrom Rel Technol*. 2001 Apr: p. 1189-98.
 27. Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *Journal of bone and mineral research*. 1997 December: p. 2098-2107.
 28. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis AJ, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013 Jan: p. 2-17.
 29. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) guidelines update: what's change and why it matters. *Kidney International*. 2017 April: p. 26-36.
 30. Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetz J, Wolf G. Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in patients with chronic kidney disease Stages 3 - 5. *Clinical Nephrology*. 2008 Oct: p. 296-305.
 31. Gal-Moscovici A, Popovtzer MM. New worldwide trends in presentation of renal osteodystrophy and its relationship to parathyroid hormone levels. *Clinical Nephrology*. 2005 Apr: p. 284-289.
 32. Sprague SM, Bellorin-Font E, Jorgetti V, Carvalho AB, Malluche HH, Ferreira A, et al. Diagnostic accuracy of bone turnover markers and bone histology in patients with CKD treated by dialysis. *American Journal of Kidney Disease*. 2016 Apr: p. 559-566.
 33. Valentin D, Martin A, Isakova T, Spaulding C, Qi L, Ramirez V, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney International*. 2016 Jan: p. 135-146.
 34. Farrow EG, Yu X, Summers LJ, Davis SI, Fleet JC, Allen MR, et al. Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Nov: p. 1146-1155.
 35. Wolf M, White KE. Coupling FGF23 production and cleavage: Iron deficiency, rickets and kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2014 Jul: p. 411-

- 419.
36. Stubbs JR, He N, Idiculla A, Gillihan R, Liu S, David V, et al. Longitudinal evaluation of FGF23 changes and mineral metabolism abnormalities in mouse model of chronic kidney disease. *Journal of Bone Mineral Research*. 2012 Jan: p. 38-46.
 37. Shimada T, Urakawa I, Isakova T, Yamazaki Y, Epstein M, Wesseling-Perry K, et al. Circulating fibroblast growth factor 23 in patients with end-stage renal disease treated by peritoneal dialysis is intact and biologically active. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010 Feb: p. 578-585.
 38. Hryszko T, Rydzewska-Rosolowska A, Brzosko S, Koc-Zorawska E, Mysliwiec M. Low molecular weight iron dextran increases fibroblast growth factor-23 concentration, together with parathyroid hormone decrease in hemodialyzed patients. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. 2012 Apr: p. 146-151.
 39. Taked Y, Komaba H, Goto S, Fujii H, Umezu M, Hasegawa H, et al. Effect of intravenous saccharated ferric oxide on serum FGF23 and mineral metabolism in hemodialysis patients. *American Journal of Nephrology*. 2011 Apr: p. 421-426.
 40. Roberts MA, Huang L, Lee D, MacGinley R, Troster SM, Kent AB, et al. Effects of intravenous iron on fibroblast growth factor 23 (FGF23) in haemodialysis patients: a randomized controlled trial. *BMC Nephrology*. 2016 Nov: p. 177-188.
 41. Schouten BJ, Hunt PJ, Livesey JH, Frampton CM, Soule SG. FGF23 elevation and hypophosphatemia after intravenous iron polymaltose: A prospective study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009 Jul: p. 2332-2337.
 42. Yamamoto S, Okada Y, Mori H, Fukumoto S, Tanaka Y. Fibroblast growth factor 23 - related osteomalacia caused by the prolonged administration of sccharated ferric oxide. *Internal Medicine*. 2012 Sep: p. 2375-2378.
 43. Sato K, Nohtomi K, Demura H, Takeuchi A, Kobayashi T, Kazama J, et al. Saccharated ferric oxide (SFO) -induced osteomalacia: in vitro inhibition by SFO of bone formation and 1,25-dihydroxy-vitamin D production in renal tubules. *Bone*. 1997 Jul: p. 57-64.
 44. Schouten BJ, Doogue MP, Soule SG, Hunt PJ. Iron polymaltose-induced FGF23 elevation complicated by hypophosphataemic osteomalacia. *Annals of clinical biochemistry*. 2009 Mar: p. 167-169.
 45. Bhattacharyya N, Chong WH, Gafni RI, Collins MT. Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012 Dec: p.

- 610-618.
46. Phan O, Maillard M, Peregaux C, Mordasini D, Stehle JC, Funk F, et al. PA21, a new iron-based nocalcium phosphate binder, prevents vascular calcification in chronic renal failure rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2013 Aug: p. 281-289.
 47. Phan O, Maillard M, Malluche HH, Stehle JC, Funk F, Burnier M. Effects of Sucroferric Oxyhydroxide compared Lanthanum Carbontae and Sevelamer Carbonate on phosphate homeostasis and vascular calcification in a rat model of chronic kidney failure. *BioMed Research International*. 2015 Jun: p. 1-9.
 48. Floege J, Covic AC, Ketteler M, Mann JF, Rastogi A, Spinowitz B, et al. Long-term effects of the iron-based phosphate binder, sucroferric oxyhydroxide, in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2015 Jun: p. 1037-1046.
 49. Soriano S, Ojeda R, Rodriguez M, Almadén Y, Rdríguez M, Martin-Malo A, et al. The effect of phosphate binders, calcium and lanthanum carbonate on FGF23 levels in chronic kidney disease patients. *Clinical Nephrology*. 2013 Jul: p. 17-22.
 50. Chang YM, Tsai SC, Shiao CC, Liou HH, Yang CL, Tung NY, et al. Effectcs of lanthanum carbonate and calcium carbonate on fibroblast growth factor 23 and hepcidin levels in chronic hemodialysis patients. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2016 Dec: p. 1-9.
 51. Parfitt MA. Renal bone disease: a new conceptual framework for the interpretation of bone histomorphometry. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2003 Jul: p. 387-403.
 52. Parfitt MA, Rao DS, Qiu S. The mineralization index-a new approach to the histomorphometric appraisal of osteomalacia. *Bone*. 2004 Jul: p. 320-325.
 53. Ferrari GO, Ferreira JC, Cavallhari RT, Neves KR, dos Reis LM, Dominguez WV, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC Nephrology*. 2014: p. 1-7.
 54. Orriss IR, Burnstock G, Arnett TR. Purinergic signalling and bone remodelling. *Current Opinion in Pharmacology*. 2010 Jun: p. 322-330.
 55. Bishay H, Ganda K, Seibel MJ. Long-term iron polymaltose infusions associated with hypophosphataemic osteomalacia: a report of two cases and review of the literature. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2017: p. 14-19.

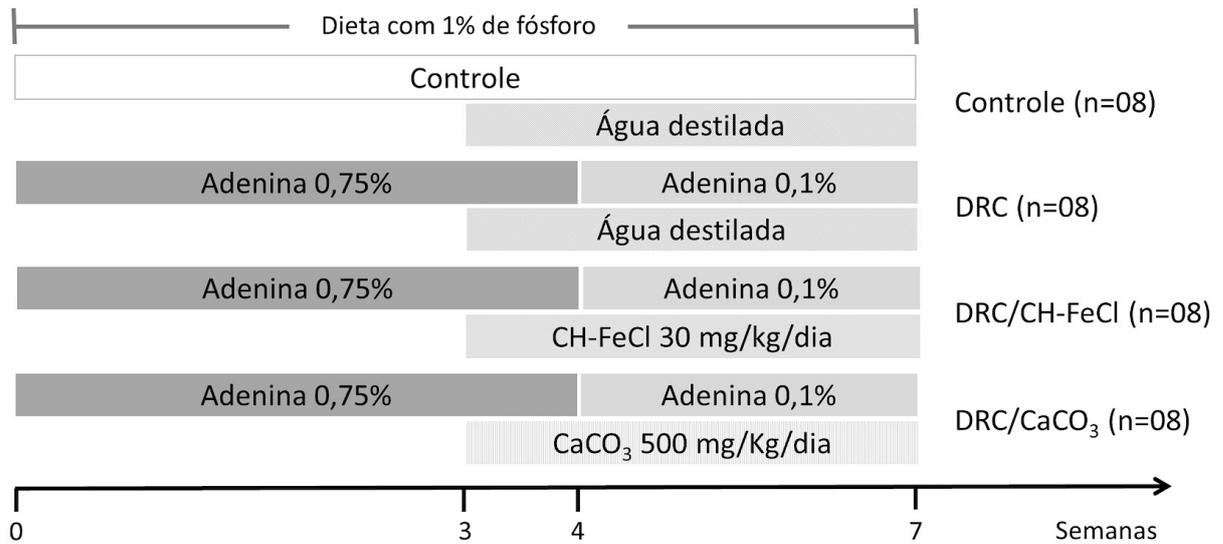


Figura 1. Desenho do estudo. DRC (doença renal crônica), CH-FeCl (complexo quitosana Fe (III)), CaCO₃ (carbonato de cálcio).

Tabela 1. Dados bioquímicos e hemoglobina: Parâmetros laboratoriais de todos os grupos ao final do estudo.

Parâmetros	Controle (n=8)	DRC (n=8)	DRC/CH-FeCl (n=8)	DRC/CaCO ₃ (n=8)
Creatinina sérica (mg/dL)	0,47 ± 0,25	0,95 ± 0,21*	0,94 ± 0,27	0,87 ± 0,51
Fosfato (mg/dL)	6,82 ± 0,52	10,60 ± 2,48*	8,62 ± 1,84	8,70 ± 1,77
Cálcio sérico total (mg/dL)	8,42 ± 1,10	10,43 ± 1,85*	10,34 ± 1,21	9,38 ± 1,56
Fração excretada de fósforo	0,20 ± 0,16	0,71 ± 0,20*	0,40 ± 0,16#	0,34 ± 0,15#
Fosfatase alcalina (U/L)	205,75 ± 62,39	561,0 ± 90,9*	432,71 ± 119,39	452,87 ± 99,13
PTH (pg/mL)	183,4 (149,9 – 611,2)	1057,02 (119,7 – 1535)	154,9 (102,2 – 179,2)	208,5 (142,3 – 438,7)
FGF23 (pg/mL)	7,42 ± 1,96	81,36 ± 37,16*	70,88 ± 11,88	68,11 ± 35,64
Ferro sérico total (µg/dL)	207,0 ± 27,84	305,0 ± 164,78	266,75 ± 67,87	253,67 ± 57,36
Hemoglobina (g/dL)	14,66 ± 0,89	10,01 ± 0,71*	9,86 ± 1,68	9,31 ± 1,01

Valores descritos em média ± SD, mediana (min – max), significância estatística $p < 0,05$. DRC – doença renal crônica; CH-FeCl – complexo quitosana-ferro (III); CaCO₃ – carbonato de cálcio. * $p < 0,05$ para DRC vs Controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo DRC.

Table 2. Análise histomorfométrica dos parâmetros ósseos femurais.

	Controle	DRC	DRC/CH-FeCl	DRC/CaCO ₃
Parâmetros estruturais				
Volume Trabecular (BV/TV, %)	22,64 ± 3,71	25,69 ± 15,83	15,25 ± 1,68	19,04 ± 11,09
Número de Trabéculas (Tb.N, mm)	4,20 ± 0,35	4,46 ± 2,48	3,20 ± 0,64	3,32 ± 2,03
Espessura Trabecular (Tb.Th, µm)	54,03 ± 8,57	57,78 ± 17,92	51,15 ± 15,22	59,63 ± 7,89
Separação Trabecular (Tb.Sp, µm)	185,25 ± 18,63	265,23 ± 229,92	273,53 ± 63,53	332,35 ± 200,79
Parâmetros de formação óssea				
Espessura Osteoide (O.Th, µm)	0,97 (0,49 – 1,46)	4,99* (2,63 – 25,68)	3,47 (1,61 – 4,11)	1,84 # (1,40 – 2,41)
Superfície Osteoide (OS/BS, %)	1,87 ± 1,13	33,20 ± 21,33*	21,39 ± 9,27	13,81 ± 10,43
Superfície Osteoblástica (Ob.S/BS, %)	1,71 ± 0,97	22,79 ± 11,67*	17,10 ± 8,21	11,76 ± 9,18
Superfície de Mineralização (MS/BS, %)	1,58 ± 0,77	2,59 ± 0,86	3,96 ± 1,45	6,59 ± 3,38
Taxa de Aposição Mineral (MAR, µm/dia)	0,37 ± 0,20	1,32 ± 0,66*	0,57 ± 0,25	0,51 ± 0,24
Taxa de Formação Óssea (BFR/BS, µm ³ /µm ² /dia)	0,01 (0,0 – 0,01)	0,03* (0,02 – 0,04)	0,03 (0,01 – 0,03)	0,03 (0,01 – 0,06)
Parâmetros de reabsorção óssea				
Superfície Erosada (ES/BS, %)	3,67 ± 0,91	14,20 ± 7,42*	12,75 ± 5,32	12,73 ± 4,66
Superfície Osteoclástica (Oc.S/BS, %)	1,09 (0,32 – 1,13)	5,32* (0,34 – 7,19)	5,29 (1,05 – 6,07)	3,32 (1,53 – 5,58)

Valores descritos em média ± SD, mediana (min – max), significância estatística $p < 0,05$. DRC – doença renal crônica; CH-FeCl – complexo quitosana-ferro (III); CaCO₃ – carbonato de cálcio. * $p < 0,05$ DRC vs Controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo DRC.

CONCLUSÃO:

Observamos que o modelo animal utilizado foi capaz de reproduzir a DRC com manutenção da disfunção renal até o final do período do experimento.

Paralelamente à disfunção renal, os animais com DRC apresentaram anemia, elevação do FGF23, da fosfatase alcalina e hiperfosfatemia. O paratormônio (PTH) elevou-se, porém devido a grande variabilidade entre os valores registrados, a diferença entre os grupos não foi significativa.

A introdução do quelante QTS-Fe(III) insolúvel proporcionou redução da fração de excreção urinária de fósforo, não interferindo nos valores do ferro sérico, demonstrando ação quelante sem evidencia de sobrecarga de ferro.

O efeito quelante da QTS-Fe(III) insolúvel proporcionou efeito quelante de fósforo semelhante ao do carbonato de cálcio.

O quelante utilizados não alteraram os valores séricos do FGF23. O paratormônio (PTH) elevou-se, porém a diferença entre os grupos não foi significativa, provavelmente devido a grande variabilidade dos valores .

Do ponto de vista da ODR, os animais com DRC desenvolveram um padrão de doença óssea de alto turnover, que não foi modificado pela ação quelante dos dois compostos testados, no período avaliado.

Estes resultados corroboram para a ação da QTS-Fe(III) insolúvel como um potencial quelante de fosfato não cálcico.

REFERÊNCIAS:

- ACHINGER, S. G.; AYUS, J. C. The role of vitamin D in left ventricular hypertrophy and cardiac function. **Kidney Int Suppl**, v. 95, p. S37-S42, 2005.
- ALFREY, A. C. Aluminium toxicity in patients with chronic renal failure. **Ther Drug Monit**, v. 15, p. 593-597, 1993.
- AMANN, K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, n. 6, p. 1599-1605, 2008.
- AMMIRATI, A. L. et al. The progression and impact of vascular calcification in peritoneal dialysis patients. **Perit Dial Int**, v. 27, n. 3, p. 340-346, 2007.
- ANDERSON, P.; RYDBERG, E.; WILLENHEIMER, R. Primary hyperparathyroidism and heart disease: a review. **European Heart Journal**, v.25, p. 1776-1787, 2004.
- ARAÚJO, S.M. et al. The renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: an overview. **Kidney Int. Suppl.** V.85, p. S54-6, 2003.
- ATKINS, R.C. The epidemiology of chronic kidney disease. **Kidney Int Suppl**, v.94, p. S14-S18, 2005.
- AUTISSIER, V; DAMMENT, S.J.; HENDERSON, R.A. Relative in vitro efficacy of the phosphate binders lanthanum carbonate and sevelamer hydrochloride. **J Pharm Sci**, v. 96, p. 2818-2827, 2007.
- AZEVEDO, V.V.C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 2.3, p. 27-34, 2007 (acessado em 12 de maio de 2011, em <http://www.dema.ufcg.edu.br/revista/index.php/REMAP/article/viewFile/46/81>).
- BAMMENS, B. et al. Removal of middle molecules and protein bound solutes by peritoneal dialysis and relation with uremic symptoms. **Kidney Int.**, v. 64, p. 2238-2243, 2003.
- BANSAL, V.K. Serum inorganic phosphorus in: **Clinical Methods: The history, physical, and laboratory examinations**. Chapter 198, Third edition, 1990, Butterworths, Boston.
- BARRETO, D.V. et al. Association of changes in bone remodeling and coronary calcification in hemodialysis patients: a prospective study. **Am J Kidney Dis**, v. 52, n. 6, p. 1139-1150, 2008.
- BAXTER, J. et al. Effect of iron(III) chitosan intake on the reduction of serum phosphorus in rats. **Journal Pharmaceutics Pharmacology**, v. 52, p. 863-874, 2000.
- BEHETS G.J. et al. Effects of efficient phosphate binding on bone in chronic renal failure rats. **Ren Fail**, v.27, n.4, p.475-484, 2005.
- BERNDT, T; SCHIAVI, S; KUMAR, R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. **Am J Renal Physiol**, v. 289, p. 1170-1182, 2005.

BERNDT T. et al. Evidence for a signaling axis by which intestinal phosphate rapidly modulates renal phosphate reabsorption. **Proc Natl Acad Sci USA**, v 104, n.26, p. 11085-11090, 2007.

BHAN, I; DUBEY, A; WOLF, M. Diagnosis and Management of Mineral Metabolism in CKD. **J Gen Intern Med**, v. 25, n. 7, p.710-716, 2010.

BHATTACHARYYA, N. et al. Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions. **Trends Endocrinol Metab**. v. 23, n. 12, p. 610-608, 2012

BISHAY R.H.; GANDA, K.; SEIBEL, M.J. Long-term iron polymaltose infusions associated with hypophosphatemic osteomalacia: a report of two cases and review of the literature. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, p. 14-19, 2017.

BLOCK G.A. et al. Effect of salivary phosphate-binding chewing gum on serum phosphate in chronic kidney disease. **Nephron Clin Pract**, v.123, p.93-101, 2013.

BLOCK, G.A. et al. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 8, p. 2208-2218, 2004.

BLOCK, G.A. et al. Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients. **Kidney Int**, v. 71, n. 5, p.438-441, 2007.

BLOCK, G.A. et al. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p. 2208-2218, 2004.

BORBA, V.Z.; MARITAS, N.C. The use of PTH in the treatment of osteoporosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 54, n. 2, p. 213-219, 2010.

BOWE, AE. et al. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 284, p. 977-981, 2001.

BROWN, E.M. Four parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 56, n. 3, p. 572-581, 1983.

BÜRGER, C. et al. Cross-linking chitosan-Fe(III), an oral phosphate binder: studies in vitro and in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 223, p. 29-33, 2001.

BURKE, S.K.; SLATOPOLSKY, E.A.; GOLDBERG, D.I. Renagel, a novel calcium- and aluminium-free phosphate binder, inhibits phosphate absorption in normal volunteers. **Nephrol Dial Transplant**, v. 12, p. 1640-1644, 1997.

CAI, Q. et al. Brief report: Inhibition of renal phosphate transport by tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia. **N Engl J Med**, v. 330, n. 23, p. 1645-1649, 1994.

Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. CEDAC final recommendation on reconsideration and reasons for recommendation: lanthanum carbonate hydrate. 2008 (acessado em 10 de maio de 2011, em http://www.cadth.ca/media/cdr/complete/cdr_complete_Fosrenol_February-29-2008.pdf)

- CANCELA, A. L. et al. Fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: effects of phosphate binder, calcitriol and calcium concentration in the dialysate. **Nephron Clin Pract**, v. 117, n. 1, p. 74-82, 2011.
- CANNATA-ANDIA, J.B.; FERNANDEZ-MARTIN, J.L. The clinical impact of aluminium overload in renal failure. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, suppl. 2, p. 9-12, 2002.
- CANTOR T. et al. Lack of comparability of intact parathyroid hormone measurements among commercial assays for end-stage renal disease patients: implication for treatment decisions. **Clin Chem**, v. 52, p. 1771-1776, 2006.
- CARTER, J.L. et al. Bone mineral metabolism and its relationship to kidney disease in a residential care home population: a cross-sectional study. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, p. 3554-3565, 2008.
- CHADBAN, S.J. et al. Prevalence of Kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. **J Am Soc Nephrol**, v.14, Suppl 2, p. S131-S138, 2003.
- CHEN W. et al. Prevalence and risk factors associated with chronic kidney disease in an adult population from southern China. **Nephrol Dial Transplant**, v.24, p. 1205-1212, 2009.
- CHERTOW, G.M. et al. Poly[allylamine hydrochloride] (RenaGel): a noncalcemic phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic renal failure. **Am J Kidney Dis**, v.29, n.1, p.66-71, 1997.
- CHERTOW, G.M.; BURKE, S.K.; RAGGI, P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. **Kidney Int**, v. 62, p. 245-252, 2002.
- CODREANU, I. et al. Prevention programmes of progressive renal disease in developing nations. **Nephrology** (Carlton), v. 11, p. 321-328, 2006.
- CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C.; QUEIROZ, D.C. Quitosana: a fibra do futuro. Fortaleza: PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, 1999.
- CUSTÓDIO, M.R. Avaliação do efeito isolado do fósforo e do paratormônio sobre o tecido cardíaco de ratos urêmicos paratireoidectomizados. 2007. 85p. (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- D'HAESE, P.C. et al. A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients. **Kidney Int**, v.63, suppl. , S73-S78, 2003.
- DAMMENT, S et al. Long-term treatment with lanthanum carbonate reduces mineral and bone abnormalities in rats with chronic renal failure. **Nephrol Dial Transplant**, v.26, p.1803-1812, 2012.
- DEMPSTER D. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.28, n.1, p. 2-17, 2013.

DAVID V, FRANCIS C, BABITT JL. Ironing out the cross talk between FGF23 and inflammation. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 312, n. 1, p. F1-F8, 2017.

DE BOER, I.H. et al. The severity of secondary hyperparathyroidism in chronic renal insufficiency is GFR-dependent, race-dependent and associated with cardiovascular disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, p. 2762-2769, 2002.

ECONS, M.J; DREZNER, M.K. Tumor-induced osteomalacia – unveiling a new hormone. **N Engl J Med**, v. 330, p. 1679-1681, 1994.

EMMETT, M. A comparison of clinically useful phosphorus binders for patients with chronic kidney failure. **Kidney Int.**, v. 66, suppl. 90, p. S25-S32, 2004.

FAGUNDES, T.; RODRIGUES, C.; BERNARDI, E. Phosphate adsorption on chitosan-Fe(III)-crosslinking: batch and column studies. **Journal Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 8, p. 1189-1199, 2001.

FAVUS, MJ; GOLTZMAN, D. Regulation of calcium and Magnesium in: **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**. Chapter 21, Seventh edition, 2009, American Society for Bone and Mineral Research, Washington.

FERRARI, G.O. Efeito da associação do carbonato de magnésio com acetato de cálcio (OSVAREN) no controle do fósforo, no hiperparatireoidismo secundário e no remodelamento ósseo em ratos urêmicos. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

FERRARI, SL; BONJOUR, JP; RIZZOLI, R. Fibroblast growth factor 23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, p. 1519-1524, 2005.

FINN, W.F. Lanthanum carbonate versus standard therapy for the efficacy in chronic maintenance hemodialysis patients. **Clin Nephrol**, v. 65, p. 191-202, 2006.

FITZPATRICK, L. A.; BILEZIKIAN, J. P.; SILVERBERG, S. J. Parathyroid hormone and the cardiovascular system. **Curr Osteoporos Rep**, v. 6, n. 2, p. 77-83, 2008.

FLISER, D. et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 2600-2608, 2007.

FLOEGE, J. et al. Long-term effects of the iron-based phosphate binder, sucroferric oxyhydroxide, in dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 30, p. 1037-1046, 2015.

FUKAGAWA, M; NII-KONO, T; KAZAMA, J.J. Role of fibroblast growth factor 23 in health and in chronic kidney disease. **Curr Opin Nephrol Hypert**, v. 14, p. 325-329, 2005.

GANESH S.K. et al. Association of elevated serum PO₄, Ca x PO₄ product and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, v.12, p. 2131-2138, 2001.

GEISSER, P.; PHILIPP, E. PA21: a novel phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic kidney disease. **Clin Nephrol**, v. 74, n. 1, p. 4-11, 2010.

- GEISSER, P.; PHILLIPP, E. PA21: a novel phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic kidney disease. **Clin Nephrol**, v. 74, n. 1, p. 4-11, 2010.
- GOETZ R et al. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 107, n. 1, p. 407-412, 2010
- GONZÁLEZ, EA. The role of cytokines in skeletal remodeling: possible consequences for renal osteodystrophy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, p. 945-950, 2000.
- GOODMAN, W.G.; QUARLES, L.D. Development and progression of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: lessons from molecular genetics. **Kidney Int**, v. 74, n. 3, p. 276-288, 2008.
- GOUVEIA C.H, JORGETTI V, BIANCO AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. **J Bone Miner Res**, v.12, p. 2098-2107, 1997.
- GRACIOLLI FG et al. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. **Kidney Int.**, v.91, p. 1436-1446, 2017.
- GUPTA, G.K. et al. Decreased expression of vitamin D receptors in neointimal lesions following coronary artery angioplasty in atherosclerotic swine. **PloS One** v.7, n.8, e42789, 2012
- GUPTA, A. Ferric citrate hydrate as a phosphate binder and risk of aluminum toxicity. **Pharmaceuticals**, v. 7, p. 990-998, 2014.
- GUTIERREZ, O et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 7, p. 2205-2215, 2005.
- GUTIÉRREZ, O.M. et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease. **Circulation**, v. 119, p. 2545-2552, 2009.
- GUTIÉRREZ, O.M. et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. **N Engl J Med**, v. 359, p. 584-592, 2008.
- GUTZWILLER, FS et al. Cost effectiveness of sucroferric oxyhydroxide compared with sevelamer carbonate in the treatment of hyperphosphatemia in patients receiving dialysis, from the perspective of the National Health Service in Scotland. **PharmacoEconomics**, v. 33, p. 1311-1324, 2015.
- HAGSTRÖM, E. et al. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. **Circulation**, v. 119, n. 21, p. 2765-2771, 2009.
- HERBETH, J. et al. Intact PTH combined with the PTH ratio for diagnosis of bone turnover in dialysis patients: a diagnostic test study. **Am J Kidney Dis**, v. 55, n. 5, p. 897-906, 2010.
- HERGESELL, O.; RITZ, E. Stabilized polynuclear iron hydroxide is an efficient, oral phosphate binder in uraemic patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 14, p. 863-867, 1999.

HEWITSON, T.D.; ONO, T.; BECKER, G.J. Small animal models of Kidney Disease: a review. Totowa; **Kidney Research**, 2008.

HONDA H et al. High fibroblast growth factor 23 levels are associated with decreased ferritin levels and increased intravenous iron doses in hemodialysis patients. **PLoS One**, v.12, n. 5, p 1-9, 2017.

HRUSKA, K.A. and TEITELBAUM S.L. Renal osteodystrophy. **N Engl J Med**, v.333, p 166-174, 1995.

HRUSKA, K.A. and SEIFERT M. Fisiopatologia do distúrbio osteomineral na doença renal crônica. In: CLIFFORD, R. **Manual de doenças osteometabólicas e distúrbios do metabolismo mineral**. 8ª ed. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica, 2014.

HUTCHISON, A.J. et al. Long-term efficacy and tolerability of lanthanum carbonate: results from a 3-year study. **Nephron Clin Pract**, v. 102, p. C61-C71, 2006.

IMANISHI, Y. et al. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. **Kidney Int**, n. 65, p. 1943-1946, 2004.

JANSSEN M. J. et al. Aluminum hydroxide, calcium carbonate and calcium acetate in chronic intermittent hemodialysis patients. **Clin Nephrol**, v. 45, p. 111-119, 1996.

JEAN, G. et al. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long hemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, p. 2792-2796, 2009(a).

JEAN, G. et al. Peripheral vascular calcification in long-haemodialysis patients: associated factors and survival consequences. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, p. 948-955, 2009(b).

JING, S.B.; YAMAGUCHI, T. Removal of phosphate from dilute phosphate solution by iron chitosan complex to be used as an oral sorbent. **Chemical Society Japanese**, v. 65, n. 7, p. 1886-1870, 1992.

JONO, S. et al. Parathyroid hormone: related peptide as a local regulator of vascular calcification. **Atheroscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, p. 1135-1142, 1997.

JORGETTI, V.; REIS, LM. Distúrbios do cálcio e do fósforo na fisiopatologia renal. 2007

K/DOQI National Kidney Foundation - Definition and classification of stages of chronic kidney disease. **Am J Kidney Dis**, v.39, n.2, Suppl 1, p.S46-S75, 2002.

K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. **Am J Kidney Dis**, v. 42, suppl. 3, p. S1-S201, 2003.

KAKUTA, T et al. Effects of sevelamer and calcium-based phosphate binders on coronary artery calcification and accumulation of circulating advanced glycation end products in hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis**, v.57, n.3, p.422-431, 2011.

KETTELER, M.; BIGGAR, P. H. Getting the balance right: assessing causes and extent of vascular calcification in chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 14, p. 389-394, 2009.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). **Kidney Int**, Suppl 113, p. S1-S130, 2009.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). **Kidney Int Supplements** v7, p. S1-S59, 2017.

KIELA, P.R.; GHISHAN, F.K. Recent advances in the renal-skeletal-gut axis that controls phosphate homeostasis. **Laboratory Investigation**, v. 89, p. 7-14, 2009.

KUMAR, R. Phosphatonin – a new phosphatoretic hormone? (lessons from tumor-induced osteomalacia and X-linked hypophosphataemia). **Nephrol Dial Transplant**, v. 12, p.11-13, 1997.

KUMAR, R. Tumor-induced osteomalacia and the regulation of phosphate homeostasis. **Bone**, v. 27, p. 333-338, 2000.

KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, p. 45-51, 1997.

KURO-O, M. The FGF23 and Klotho system beyond mineral metabolism. **Clin Exp Nephrol**. v. 21, Suppl 1, p. 64-69, 2017.

KUROSU, H. et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, v. 309, p. 1829-1833, 2005.

LANNA, CM. et al. Parathyroid hormone secretion in chronic human endogenous hypercortisolism. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 2, p. 229-236, 2002.

LARSSON, T. et al. Circulating concentration of FGF-23 increases as a renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. **Kidney Int**, v. 64, p. 2272-2279, 2003.

LEIFSSON, B.G.; AHREN, B. Serum calcium and survival in a large health-screening program. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, p. 2149-2153, 1996.

LEVEY, A.S. et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney Int**, v. 67, p. 2089-2100, 2005.

LEVIN, A. et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. **Kidney Int**, v. 71, p. 31-38, 2007.

LEVIN, A. et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease results of SEEK. **Kidney Int**, v. 71, p. 31-38, 2007.

- LI, Y.C. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin system. **J Clin Invest**, v. 110, n. 2, p. 229-238, 2002.
- LIND, L. et al. Reduction of blood pressure during long-term treatment with active vitamin D (alphacalcidol) is dependent on plasma rennin activity and calcium status: a double-blind, placebo-controlled study. **Am J Hypertens**, v. 2, p. 20-25, 1989.
- LIND, L. et al. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. **J Clin Epidemiol**, v. 50, p. 967-973, 1997.
- LIND, L. et al. Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-aged men. **Am J Hypertens**, v. 8, p. 894-901, 1995.
- LIU, S; QUARLES, LD. How fibroblast growth factor 23 works. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p.1637-1647, 2007.
- LIU, S. et al. Regulation of fibroblast growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. **J Biol Chem**, v. 278, p. 37419-26, 2003.
- LOGHMAN-ADHAM, M. Safety of new phosphate binders of chronic renal failure. **Drug Safety**, v. 26, n. 15, p. 1093-1115, 2003.
- LONDON, G.M. et al. Arterial calcification and bone histomorphometry in end-stage renal disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p. 1943-1951, 2004.
- LONDON, G.M. et al. Mineral metabolism and arterial function in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 2, p. 613-620, 2007.
- LOU ARNAL, L.M. et al. Prevalence of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated in primary care. **Nefrologia**, v. 30, n. 5, p. 552-556, 2010.
- MALBERTI, F.; FARINA, M.; IMBASCIATTI, E. The PTH-calcium curve and the set point of calcium in primary and secondary hyperparathyroidism. **Nephrol Dial Transplant**, v. 14, p. 2398-2406, 1999.
- MARTIN, G.R. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. **Genes Dev**, v. 12, n. 1, p. 1571-1586, 1998.
- MARTIN, K.J.; GONZÁLEZ, E.A. Metabolic bone disease in chronic kidney disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 3, p.875-885, 2007.
- MATHUR, N.K.; NARANG, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **J Chem Educ**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.
- MATSUMARA, Y. et al. Identification of the human Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted Klotho protein. **Biochem and Biophys Res Commun**, v. 242, p. 626-630, 1998.
- MATSUO K, OTAKI N. Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. **Cell Adh Migr**, v. 6(2), p. 148-156, 2012

MAYER, G.P.; HURST, J.G. Sigmoidal relationship between parathyroid hormone secretion rate and plasma calcium concentration in calves. **Endocrinology**, v. 102, n. 04, p 1036-1042, 1978.

MCINTYRE CW et al. Iron-magnesium hydroxycarbonate (Fermagate): a novel non-calcium-containing phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic hemodialysis patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, p.401-409, 2009.

MCKEEHAN, W.L.; WANG, F; KAN, M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 59, p. 135-176, 1998.

MEJÍA, N. et al. Chronic kidney disease – mineral and bone disorder: a complex scenario. **Nefrologia**, v. 31, n. 5, p. 514-519, 2011.

MELAMED M. et al. Third-generation parathyroid hormone assay an all-cause mortality in incident dialysis patients: the CHOICE study. **Nephrol Dial Transplant**, v.23, p. 1650-1658, 2008. (b)

MELAMED M.L. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease: results from NHANES 2001 to 2004. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 6, p. 1179-1185, 2008. (a)

MENDOZA J.M. et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Inflammation in CKD. **Clin J Am Soc Nephrol**. v. 7, n.7, p. 1155–1162, 2012.

MILLER, M.A. et al. Disparate effects of mild, moderate, and severe secondary hyperparathyroidism on cancellous and cortical bone in rats with chronic renal insufficiency. **Bone**, v. 23, p. 257-266, 1998.

MIRAMS, M. et al. Bone as a source of FGF-23: regulation by phosphate? **Bone**, v. 35, p. 1192-1199, 2004.

MISIOROWSKI, W. Parathyroid hormone and its analogues – molecular mechanisms of action and efficacy in osteoporosis therapy. **Pol J Endocrinol**, v. 62, n. 1, p. 73-78, 2011.

MITTMAN, N. et al. Treatment of secondary hyperparathyroidism in ESRD: a 2-year, single-center crossover study. **Kidney Int**, v. 78, Suppl 117, p. S33-S36, 2010.

MOE, S.M. et al. A Rat Model of Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder (CKD-MBD) and the Effect of Dietary Protein Source. **Kidney Int**, v. 75, n. 2, p. 176-184. 2009.

MOE, S.M.; DRÜEKE, T.B. Management of secondary hyperparathyroidism: the importance and the challenge of controlling parathyroid hormone levels without elevating calcium, phosphorus, and calcium-phosphorus product. **Am J Nephrol**, v. 23, p. 369-379, 2003.

MOE, S.M. et al. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease-mineral and boné disorder (CKD-MBD). **Kidney Int Suppl**, v.113, p. S1-S130, 2009

MOLONY, D.A.; BHAMIDIPATI, M. Accumulation of metals and minerals from phosphate binders. **Bloob Purif**, v. 23, suppl. 1, p. 2-11, 2005.

- MOLONY, D.A.; STEPHENS B.W. Derangements in phosphate metabolism in chronic kidney diseases/end stage renal disease: therapeutic considerations. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 18, n. 2, p. 120-131, 2011.
- MORANNE, O. et al. Timing of Onset of CKD-Related Metabolic Complications. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, p. 164-171, 2009.
- MURER, H. et al. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. **Annu Rev Physiol**, v. 65, p. 531-542, 2003.
- MURRAY R.D. et al. Parathyroid hormone (PTH) decreases sodium-phosphate cotransporter type IIa (NpT2a) mRNA stability. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 304, p. 1076-1085, 2013
- NAKANISHI, S. et al. Serum fibroblast growth factor-23 levels predict the future refractory hyperparathyroidism in dialysis patients. **Kidney Int**, v. 67, p. 1171-1178, 2005.
- NAKANO, T. et al. Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama Study. **Am J Kidney Dis**, v. 55, n. 1, p.21-30, 2010.
- NAKASHIMA, A. et al. Different risk factors for the maximum and the mean carotid intima-media thickness in hemodialysis patients. **Intern Med**, v. 42, n. 11, p. 1095-1099, 2003.
- NASTOU D. et al. Next-generation phosphate binders: Focus on iron-based binders. **Drugs**, v. 74, p. 863-877, 2014.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. **Am J Kidney Dis**, v. 42, suppl 3, p. S1-S201, 2003.
- NAVANEETHAN, S.D. et al. Benefits and harms of phosphate binders in CKD: a systematic review of randomized controlled trials. **Am J Kidney Dis**, v. 54, n. 4, p. 619-637, 2009.
- NELSON, R. Novel phosphate binder is effective in patients on haemodialysis. **Lancet**, v. 360, p. 1483, 2002.
- NEGRI, A.L.; TORRES, P.A. Iron-based phosphate binders: do they offer advantages over currently available phosphate binders? **Clinic Kidney J**, v. 8, p. 161-167, 2015.
- NITTA K, NAGANO N, TSUCHIYA K. Fibroblast growth factor 23/klotho axis in chronic kidney disease. **Nephron Clin Pract**. v. 128, n. 1, p. 1-10, 2014.
- NUGENT, R.A. et al. The Burden of Chronic Kidney Disease on Developing Nations: A 21st Century Challenge in Global Health. **Nephron Clin Pract**, v. 118, p. 269-77, 2011.
- O'NEILL, C.W.; LOMASHVILI, Koba A. Recent progress in the treatment of vascular calcification. **Kidney Int**, v. 78, n. 12, p. 1232-1239, 2010.
- ODÍLIO, B.G. and DE BRITO, D. Basic process for chitin extraction and chitosan production from carciniculture wastes. **R Bras Agrocência**, v.14, n.1, p.91-100, 2008.

- OGIRIMA, T et al. Sex difference of adenine effects in rats: renal function, bone mineral density and sex steroidogenesis. **Endocrine Journal**, v. 53, p. 407-413, 2006.
- OH, MS and URIBARRI J. What Can We Learn from the Saga of Chitosan Gums in Hyperphosphatemia Therapy? **Clin J Am Soc Nephrol**. 2014 Jan 9. [Epub ahead of print]
- OKADA, H et al. Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. **Clin Exp Nephrol**, v.3, p.82-88, 1999.
- OLIVEIRA, R.B.; MOYSES, R.M. FGF-23: state of the art. **J Bras Nefrol**, v.32, n.3, p. 316-323, 2010.
- PARK, C.W. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. **Am J Kidney Dis**, v. 33, p. 73-81, 1999.
- PAULA, F.J. et al. Effect of metabolic control on parathyroid hormone secretion in diabetic patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 9, p. 1139-1145, 2001.
- PAULA, J.F. A insuficiência óssea na doença renal crônica: papel do paratormônio. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 9, p. 1059-1060, 2009.
- PENIDO M.G.; ALON U.S. Phosphate homeostasis and its role in bone health. **Pediatr Nephrol**, v. 27, p. 2039-2048, 2012.
- PEREIRA, LC. et al. Parathyroid hormone secretion in women in late menopause submitted to EDTA-induced hypocalcemia. **Maturitas**, v. 59, n. 1, p. 91-94, 2008.
- PHAN, O. et al. Sevelamer prevents uremia-enhanced atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 112, p. 2875-2882, 2005.
- PHELPS, K.R. and MASON, D.L. Parameters of phosphorus homeostasis at normal and reduced GFR: theoretical considerations. **Clin Nephrol**, v. 83, p. 167-176, 2015.
- PHELPS, K.R.; MASON, D.L.; STOKE K.S. Parameters of phosphorus homeostasis at normal and reduced GFR: empiric observations. **Clin Nephrol**, v. 83, p. 208-217, 2015.
- PIAZZA, C.E.; PALAORO, L.C. Avaliação toxicológica do complexo quitosana-ferro(III) solúvel. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia), Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2001.
- POTTS, J.T. Parathyroid hormone: past and present. **Journal of Endocrinology**, v. 187, p. 311-325, 2005.
- PRICE, P.A.; ROUBLICK A.M.; WILLIAMSON, M.K. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. **Kidney Int**, v. 70, p. 1577-1583, 2006.
- QUARLES L.D. Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. **Exp Cell Res**, v. 318, p. 1040-1048, 2012
- RAGGI, P. et al. Coronary artery calcium to predict all-cause mortality in elderly men and women. **J Am Coll Cardiol**, v. 52, n. 1, p. 17-23, 2008.

- RAINONE F. et al. Calcium sensing receptor and renal mineral ion transport. **J Endocrinol Invest**, v. 34, p. 8-12, 2011.
- RAVI K., MAJETI N.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive e functional polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
- REICHEL H. et al. Influence of PTH assay methodology on differential diagnosis of renal boné disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 759-768, 2003.
- REIS, LM e JORGETTI V. Distúrbios do Cálcio e do Fósforo in: ZATZ R. **Fisiopatologia Renal**. Capítulo 13, Segunda edição, 2002, Atheneu, São Paulo.
- RIANCHO, J.A.; DELGADO-CALLE J. Osteoblast-osteoclast interaction mechanisms. **Reumatol Clin**, v.7(S2), p. S1-S4, 2011.
- RICCARDI, D; BROWN, E.M. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 298, p. 485-499, 2010
- RÍOS-HOYO, A; GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G. New dietary supplements for obesity: What we currently know. **Curr Obes Rep**, v.5, p.262-270, 2016.
- RODRIGUES, U. Formação dos Comitês de Ética. In: LAPCHIK, V.; MATTARAIA, V.; KO, G. **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009.
- RODRIGUEZ, M.; NEMETH, E.; MARTIN, D. The calcium-sensing receptor: a key factor in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 288, p. 253-264, 2005.
- RODBY, R.A. et al. Ferric citrate, an iron-based phosphate binder, reduces Health Care cost in patients on dialysis based on randomized clinical trial data. **Drugs**, v. 15, p. 271-279, 2015.
- ROSENBAUM, D.P. et al. Effect of RenaGel, a non-absorbable, cross-linked, polymeric phosphate binder, on urinary phosphorus excretion in rats. **Nephrol Dial Transplant**, v.12, p.961-964, 1997.
- ROSTAND, S.G. et al. Myocardial calcification and cardiac dysfunction in chronic renal failure. **Am J Med**, v. 85, p.651-657, 1988.
- ROSTAND, S.G.; DRUEKE, T.B. Parathyroid hormone, vitamin D and cardiovascular disease in chronic renal failure. **Kidney Int**, v. 56, p.383-392, 1999.
- SANCHEZ, C.P. et al. Bone elongation in rats with renal failure and mild or advanced secondary hyperparathyroidism. **Kidney Int**, v. 65, p. 1740-1748, 2004.
- SAVICA, V et al. Phosphate binders and management of hyperphosphatemia in end-stage renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, v.21, p.2065-2068, 2006.
- SAVICA, V. et al. Phosphate salivary secretion in hemodialysis patients: implications for the treatment of hyperphosphatemia, **Nephron Physiol**, v. 105, p. 52-55, 2007.
- SAVICA, V. et al. Salivary phosphate secretion in chronic kidney disease. **J Renal Nutr**, v. 18, p. 87-90, 2008.

SAVICA, V. et al. Salivary phosphate-binding chewing gum reduces hyperphosphatemia in dialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, p. 639-644, 2009.

SCHÖNINGER, L.M.R. Avaliação dos efeitos do complexo quitosana ferro-III solúvel e insolúvel em animais tratados com aloxano. 2007. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

SCHÖNINGER, L.M.R. et al. Chitosan iron(III) reduces phosphorus levels in alloxan diabetes-induced rats with signs of renal failure development. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 106, n. 6, p. 467-471, 2010.

SCHWARZ, U. et al. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, p. 218-223, 2000.

SEGERSTEN, U. et al. 25-Hydroxyvitmain D3 -1 α -Hydroxylase Expression in Normal and Pathological Parathyroid Glands. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 87, n. 6, p. 2967-2972, 2002.

SESSO, R.; FERRAZ, M.B. Avaliação crítica do sevelamer no tratamento da hiperfosfatemia em pacientes com insuficiência renal crônica. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, n. 1, p. 103-108, 2003.

SHERRARD D.J. et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure – An evolving disorder. **Kidney Int**, v.43, p. 436-442, 1993.

SHIGEMATSU, T. et al. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. **Am J Kidney Dis**, v. 44, p. 250-256, 2004.

SHIMADA, T. et al. Cloning and characterization of FGF-23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, n.11, p. 6500-6505, 2001.

SHOBEIRI, N.; ADAMS, M.A.; HOLDEN, R.M. Vacular calcification in animal models of CKD: A review. **Am J Nephrol**, v. 31, p. 471-48, 2010.

SHOJI, T. et al. Impaired metabolism of high density lipoprotein in uremic patients. **Kidney Int**, v. 41, n. 6, p. 1653-1661, 1992.

SILVER, J. Molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, Supl 5, p. 2-7, 2000.

SILVER J.; KILAV R.; NAVEH-MANY T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 283, p. 367-376, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Diretrizes Brasileiras de Prática Clínica para o Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica. **J Bras Nefrol**, v. 30, n. 1, Supl 2, 2008.

SOUBERBIELLE, J.; ROTH, H.; FOUQUE, D. Parathyroid hormone measurement in CKD. **Kidney Int**, v. 77, n. 2, p. 93-100, 2010.

SPIEGEL D.M.; BRADY K. Calcium balance in normal individuals and in patients with chronic kidney disease on low- and high-calcium diets. **Kidney Int**, v. 81, p. 1116-1122, 2012.

SPIEGEL, DM et al. Magnesium carbonate is an effective phosphate binder for chronic hemodialysis patients: a pilot study. **J Ren Nutr**, v.17, p.416-422, 2007.

SUI, Y.B. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular calcification in rats. **Peptides**, v. 42, p. 25-34. 2013.

SUKI, W.N. and MOORE, L.W. Phosphorus regulation in chronic kidney disease. **Methodist Debaquey Cardiovasc J**, v. 12, p. 6-9, 2016.

TAMAGAKI, K. et al. Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, p. 651-659, 2006.

TAMARA, I. et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. **Kidney Int.**, v.79, p. 1370–1378, 2011

TENG, M. et al. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. **N Engl J Med**, v. 349, n. 5, p. 446-456, 2003.

TENTORI, F. et al. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). **Am J Kidney Dis**, v. 52, n. 3, p.519-530, 2008.

TERAI, K. et al. Vascular calcification and secondary hyperparathyroidism of severe chronic kidney disease and its relation to serum phosphate and calcium levels. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 1267-1278, 2009.

TITAN, SM. et al. FGF-23 as a predictor of renal outcome in diabetic nephropathy [abstract]. **J Am Soc Nephrol**, PO 1872, 2009.

TOMIYAMA, C. et al. The impact of traditional and non-traditional risk factors on coronary calcification in pre-dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, n. 9, p. 2464-2471, 2006.

TONELLI, M.; PANNU, N.; MANNS, B. Oral phosphate binders in patients with kidney failure. **N Engl J Med**, v. 362, p. 1312-1324, 2010.

TORRES, PU. et al. Klotho: an anti-aging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. **Kidney Int**, v. 71, p. 730-737, 2007.

TZANAKIS IP and OREOPOULOS DG. Beneficial effects of magnesium in chronic renal failure: a foe no longer. **Int Urol Nephrol**, v. 41, p. 363-371, 2009.

TZANAKIS IP. et al. Magnesium carbonate for phosphate control in patients on hemodialysis: a randomized controlled trial. **Int Urol Nephrol**, v. 40, p. 193-201, 2008.

URAKAWA, I. et al. Klotho converts canonical FGF receptor into specific receptor for FGF-23. **Nature**, v. 444, p. 770-774, 2006.

- VALCARENGHI, D. Avaliação toxicológica crônica do polímero quitosana-ferro(III) solúvel. 2006. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.
- VIEIRA, J.G. et al. Heterogeneity of carboxyl-terminal parathyroid hormone (PTH) circulating forms in patients with hyperparathyroidism due to end stage renal disease. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 9, p. 1074-1078, 2009.
- WALKER, M.D. et al. Carotid vascular abnormalities in primary hyperparathyroidism. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 94, p. 3849-3856, 2009.
- WALSH A.M. et al. Multi-functional roles of chitosan as a potential protective agent against obesity. **PLoS One**, v.8, n.1, e53828, 2013.
- WANG, T.J. et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. **Circulation**, v. 117, n. 4, p. 503-511, 2008.
- WATANABE, R. et al. Impact of cardiovascular calcification in nondialyzed patients after 24 months of follow-up. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 5, n. 2, p. 189-194, 2010.
- WEBER, T.J. et al. Serum FGF-23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. **J Bone Min Res**, v. 18, p. 1227-1234, 2003.
- WILKES, B.M. et al. Simultaneous lowering of serum phosphate and LDL-cholesterol by sevelamer hydrochloride (RenaGel) in dialysis patients. **Clin Nephrol**, v.50, n.6, p. 381-386, 1998.
- WOLF, M.; KOCH T.A.; BREGMAN, D.B. Effects of iron deficiency anemia and its treatment on Fibroblast Growth Factor 23 and phosphate homeostasis in women. **Journal of Bone and Mineral Research**, p. 1793-1803, 2013.
- WU-WONG, J.R. et al. Effects of vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 186, n. 1, p. 20-28, 2006.
- WUTHRICH, R.P. et al. Randomized clinical trial of the iron-based phosphate binder PA21 in hemodialysis patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.8, n.2, p.280-289, 2013.
- YAMAMOTO, M. et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho. **J Biol Chem**, v. 280, p. 38029-34, 2005.
- YAMASHITA, T. et al. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. **J Biol Chem**, v. 277, p. 28265-70, 2002.
- YAMASHITA, T.; YOSHIOKA, M.; ITOH, N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventro-lateral thalamic nucleus of the brain. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 277, n. 2, p. 494-498, 2000.
- YOKOZAWA, T. et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. **Nephron**, v. 44, p. 230-234, 1986.

YOUNG, E.W. et al. Predictors and consequences of altered mineral metabolism: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. **Kidney Int**, v. 67, p. 1179-1187, 2005.

ZHANG H.L. et al. Effects of chitosan and water-soluble chitosan micro- and nanoparticles in obese rats fed a high-fat diet. **Int J Nanomedicine**, v.7, p.4069-76, 2012.

ZITTERMANN, A. et al. Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? **J Am Coll Cardiol**, v. 41, n. 1, p. 105-112, 2003.

ANEXOS:



Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

Doi: 10.1111/bcpt.12849

Chitosan-Fe (III) Complex as a Phosphate Chelator in Uraemic Rats: A Novel Treatment Option

Wander Barros do Carmo^{1,2,3}, Bárbara Bruna Abreu Castro^{2,3}, Clóvis Antônio Rodrigues⁴, Melani Ribeiro Custódio⁵ and Helady Sanders-Pinheiro^{2,3,6}

¹Division of Clinical Medicine of the Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ²Interdisciplinary Center for Laboratory Animal Studies (NIDEAL), Center for Reproductive Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ³Interdisciplinary Center for Studies and Research in Nephrology (NIEPEN), Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ⁴Nucleus of Chemical-Pharmaceutical Research (NIQFAR) of the University of Vale do Itajaí, Itajaí, Brazil, ⁵Division of Nephrology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ⁶Division of Nephrology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

(Received 3 March 2017; Accepted 12 July 2017)

Abstract: Phosphate retention and hyperphosphataemia are associated with increased mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). We tested the use of cross-linked iron chitosan III (CH-FeCl) as a potential phosphate chelator in rats with CKD. We evaluated 96 animals, divided equally into four groups (control, CKD, CH-FeCl and CKD/CH-FeCl), over 7 weeks. We induced CKD by feeding animals an adenine-enriched diet (0.75% in the first 4 weeks and 0.1% in the following 3 weeks). We administered 30 mg/kg daily of the test polymer, by gavage, from the third week until the end of the study. All animals received a diet supplemented with 1% phosphorus. Uraemia was confirmed by the increase in serum creatinine in week 4 (36.24 ± 18.56 versus 144.98 ± 22.1 $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.0001$) and week 7 (41.55 ± 22.1 versus 83.98 ± 18.56 $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.001$) in CKD animals. Rats from the CKD group treated with CH-FeCl had a 54.5% reduction in serum phosphate (6.10 ± 2.23 versus 2.78 ± 0.55 mmol/L) compared to a reduction of 25.6% in the untreated CKD group (4.75 ± 1.45 versus 3.52 ± 0.74 mmol/L , $p = 0.021$), between week 4 and week 7. At week 7, renal function in both CKD groups was similar (serum creatinine: 83.98 ± 18.56 versus 83.10 ± 23.87 $\mu\text{mol/L}$, $p = 0.888$); however, the CH-FeCl-treated rats had a reduction in phosphate overload measured by fractional phosphate excretion (FEPi) (0.71 ± 0.2 versus 0.4 ± 0.16 , $p = 0.006$) compared to the untreated CKD group. Our study demonstrated that CH-FeCl had an efficient chelating action on phosphate.

Approximately 70% of patients with chronic kidney disease (CKD) have impaired phosphorus metabolism, which contributes to high cardiovascular mortality in this population [1,2]. As kidney dysfunction progresses and renal phosphate excretion is impaired, fractional excretion of phosphate (FEPi) and fibroblast growth factor 23 (FGF23) increase at early phases of CKD, while phosphataemia and parathyroid hormone (PTH) levels are elevated at later stages. These changes have been recognized as the most common indicators of mineral-bone disorder that is associated with CKD (CKD-MBD) [3–6]. The current treatment approach aims to reduce the phosphate overload through dietary restriction and the use of substances with phosphate-chelating power in the intestinal tract [4,7]. Calcium-based phosphate chelators, although widely used, have been progressively replaced by non-calcium chelators, such as sevelamer and lanthanum, due to their associated increased risk of vascular calcification [8–13]. Recently, the emergence of novel alternatives, such as iron-based chelators, that is, ferric citrate and sucroferric oxidation (PA21), has expanded the treatment options for CKD-MBD [14–17].

A new insoluble complex of chitosan and iron (III) chloride, the cross-linked iron chitosan III (CH-FeCl), has been investigated as a possible chelator with the advantages of the

adsorption power of chitosan. CH-FeCl combines the chelation properties of chitosan and iron, without the risk of increased iron availability and consequent toxicity. This compound has been shown to reduce phosphate absorption in the intestine of diabetic rats with hyperphosphataemia induced by diet phosphorus overload [18–20]. However, in those studies, the animals did not have CKD or CKD-MBD, which limits the clinical usefulness of the results.

Our study aimed to evaluate the power of the CH-FeCl complex as a phosphate chelator in an experimental model of CKD with confirmed loss of renal function that mimics phosphate retention and hyperphosphataemia secondary to CKD in human beings.

Materials and methods

Animals. We used 8- to 12-week-old Wistar rats, weighing approximately 250 g, from a colony at the Center for Reproductive Biology of Universidade Federal de Juiz de Fora. Animals were housed in climate-controlled shelves at 22°C, in a 12-hr light/12-hr dark cycle. Water and food pellets were available *ad libitum*. These housing conditions and experimental procedures were in accordance with Brazilian federal regulations (Brazilian Federal Law 11,794, 8 October 2008, and the directives of the Brazilian Council on Animal Testing Control – CONCEA), as well as Directive 86/609/EEC (the 1986 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used For Experimental and other Scientific Purposes), and the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adopted by

Author for correspondence: Helady Sanders-Pinheiro, Rua Benjamin Constant, 1044/1001, Juiz de Fora, Minas Gerais 36015-400, Brazil (e-mail heladysanders@gmail.com).

the American Society of Toxicology in 1989. The experiments were carried out after protocol approval by the Universidade Federal de Juiz de Fora Ethics Committee for Animal Research (031/2013, CEUA-UFJF).

Preparation of the CH-FeCl complex. Chitosan (240 kD, Purifarma, São Paulo, SP, Brazil) was dissolved in a 0.1M Fe(NO₃)₃ aqueous solution (Vetec, Rio de Janeiro, SP, Brazil) over 4 hr, then precipitated with acetone, resulting in an orange precipitate, which was filtered and washed with acetone to remove excess Fe(NO₃)₃, and vacuum-dried. This product was then added to a 15% glutaraldehyde solution in acetone (Merck, Cotia, SP, Brazil) for 24 hr, filtered and washed with water to remove excess glutaraldehyde. The resulting polymer was characterized according to the literature [21]. The iron content was 80 mg/g, as determined by the spectrophotometric method with 1,10-phenanthroline as a complexing agent and a Shimadzu UV1600 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The entire procedure was carried out at the Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) Chemistry Laboratory.

Experimental model and design. After a week of acclimatization, 96 rats were divided into four groups: control, CH-FeCl, CKD and CKD/CH-FeCl. Uraemia was induced in the CKD and CKD/CH-FeCl groups (n = 48 animals) by feeding the animals an adenine-enriched diet (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP). We included 0.75% adenine in the diet until week 4 to induce CKD [22,23]. In the next 3 weeks, we used 0.1% adenine to maintain CKD, as previously described [24]. We added the maintenance phase [24] to the original protocol of 0.75% adenine for 4 weeks [22,23] in order to prevent renal function recovery that can occur in some animals according to a pilot study (data not shown), and to better mimic CKD-MBD [24]. The control and CH-FeCl groups (n = 48 animals) were fed a standard diet (Pragsoluções Biosciências, Jaú, Brazil) over the entire 7 weeks of the experiment. All diets were enriched in phosphorus (1% total phosphorus). Body-weight and food intake were measured weekly.

Eight animals from each group were killed at the fourth, sixth and seventh weeks to monitor disease progression. On the previous day, animals were kept in metabolic cages and urine was collected for 24 hr. Animals were anaesthetized by an intraperitoneal injection of 10 mg/kg xylazine and 90 mg/kg ketamine (König SA, Avellaneda, Argentina), and blood samples were obtained by heart puncture, without evidence of significant haemolysis, followed by diaphragm rupture [25].

Urine samples were centrifuged at 3000 g for 10 min. in a refrigerated centrifuge (Sorvall, Suwanee, GA, USA). Blood was also centrifuged under the same conditions to obtain the serum. Both types of samples were then stored in cryogenic tubes at -80°C (Thermo Scientific, Suwanee, GA, USA) until further analysis.

CH-FeCl: CH-FeCl was administered daily by gavage from the third week until the end of the study at a dosage of 30 mg/kg daily [19], whereas animals in the control and CKD groups received gavage with a 0.9% NaCl physiological solution over the same period.

Biochemical analysis and renal function. Levels of serum and urinary creatinine, serum and urinary phosphate, total serum calcium and total serum iron were measured with a Labmax Progress automatic analyser (Labtest Diagnostica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil).

Statistical analysis. Data normality was assessed by the Shapiro-Wilk test and is presented as mean ± standard deviation. Comparison between groups was performed with Student's *t*-test, whereas the analysis of variance (ANOVA) was used for comparisons of more than two groups, followed by the Bonferroni test. The difference was considered significant when *p* < 0.05. All analyses were carried out with the IBM SPSS Statistics 21 program (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Of the initial group of 96 animals, four died during the study: one from the CKD group during the third week, one from the CH-FeCl group during the fourth week and two from the CH-FeCl group during the sixth week. Weight, food intake and the biochemical parameters analysed were not affected by the use of CH-FeCl during the treatment period (fig. 1 and table 1).

After the introduction of adenine into the diet, we observed weight loss in the animals and significant changes in biochemical parameters. In the CKD group, there was a reduction in renal function, measured by increased creatinine levels at week 4 (144.98 ± 22.1 versus 36.24 ± 18.56 $\mu\text{mol/L}$, *p* = 0.0001) and week 7 (83.98 ± 18.56 versus 41.55 ± 22.1 $\mu\text{mol/L}$; *p* = 0.001) compared to the control group. The urinary volume also increased (54.2 ± 7.0 versus 15.4 ± 8.9 mL/24 hr, *p* = 0.0001) from week 4 to week 7 (figs 1 and 2, table 1).

Serum creatinine (*p* = 0.001), phosphate (*p* = 0.001), calcium (*p* = 0.02) and FEPi (*p* = 0.0001) values were higher in the CKD group than in the control group by week 7 (table 1).

Conversely, when we evaluated serum phosphate variation between week 4 and week 7 in the CKD/CH-FeCl group, we observed a significant decline in serum phosphate of 54.5% in this group (6.10 ± 2.23 versus 2.78 ± 0.55 mmol/L) compared to the untreated CKD group, which showed a 25.6% reduction (*p* = 0.021; 4.75 ± 1.45 versus 3.52 ± 0.74 mmol/L) (fig. 3).

We observed that the CKD group treated with CH-FeCl had significantly lower FEPi values (0.71 ± 0.20 versus 0.40 ± 0.16 , *p* = 0.006) compared to those of the CKD group at week 7; however, there were no significant differences in renal function between the two groups (serum creatinine: 83.98 ± 18.56 versus 83.10 ± 23.87 $\mu\text{mol/L}$, *p* = 0.888) (table 1).

There was no difference in total serum iron values between the groups at week 7 (table 1).

Discussion

Loss of renal function leads to the progressive retention of certain electrolytes, such as phosphate. When the glomerular filtration rate is below 20 mL/min/1.73 m², kidneys increase the rate of urinary phosphate excretion, indicated by FEPi, to maintain the serum phosphate balance [26]. Thus, substances that chelate intestinal phosphate, by reducing its absorption and bioavailability, lead to a subsequent reduction in the excretion of urinary phosphate and FEPi [27,28]. Although calcium-based chelators are often used in hyperphosphataemia therapy, mainly due to their greater availability and lower cost compared to non-calcium chelators, their association with high serum calcium levels and the risk of metastatic calcification warrants the development of calcium-free chelators. On the other hand, the available non-calcium compounds, such as sevelamer and lanthanum carbonate, also have limitations due to their high costs and the absence of proven safety in long-term

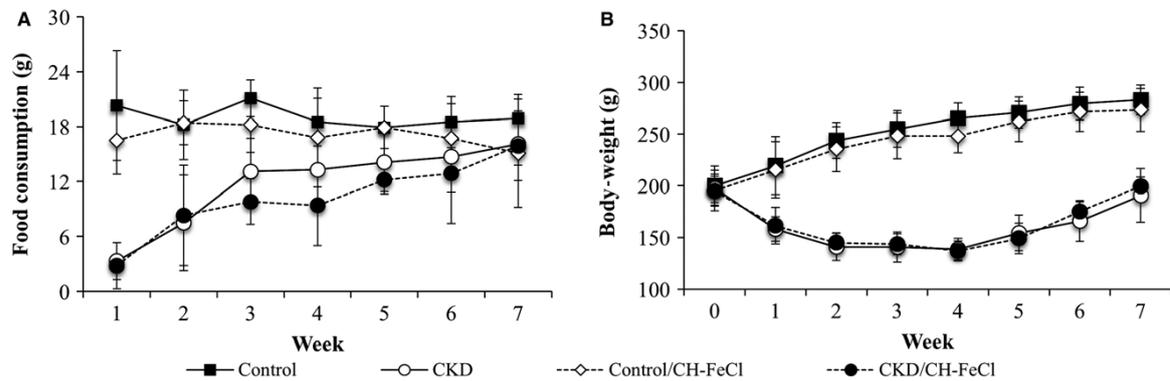


Fig. 1. Food intake (A) and body-weight (B). Treatment with the cross-linked iron chitosan III (CH-FeCl) complex did not affect any of these parameters, either in the animals in the chronic kidney disease (CKD) or those in the control groups. In the CKD groups (with or without CH-FeCl), there was a reduction in weight gain and food intake until week 4, during which time the animals were fed with a 0.75% adenine diet. After week 4, with the reduction in the adenine concentration to 0.1%, food intake and weight gain were recovered in the CKD groups compared to the control groups. Twenty-four animals were studied in each group, and eight animals from each group were killed at weeks 4, 6 and 7. Values are expressed as mean \pm S.D.

Table 1.

Haemoglobin and biochemical data: Laboratory parameters of the uraemic and non-uraemic rats treated and not treated with CH-FeCl at the end of 7 weeks.

Parameter	Control (n = 8)	Control/CH-FeCl (n = 8)	CKD (n = 8)	CKD/CH-FeCl (n = 8)	p^1	p^2	p^3
Serum creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	41.55 \pm 22.1	48.62 \pm 22.98	83.98 \pm 18.56	83.10 \pm 23.87	0.517	0.001	0.888
Phosphate (mmol/L)	2.20 \pm 0.16	2.20 \pm 0.13	3.52 \pm 0.74	2.78 \pm 0.55	0.366	0.001	0.091
Total serum calcium (mmol/L)	2.10 \pm 0.27	2.14 \pm 0.30	2.60 \pm 0.46	2.58 \pm 0.30	0.775	0.02	0.913
Fractional excretion of phosphorus	0.20 \pm 0.16	0.18 \pm 0.13	0.71 \pm 0.20	0.40 \pm 0.16	0.858	0.0001	0.006
Haemoglobin (g/dL)	14.66 \pm 0.89	15.00 \pm 0.59	10.01 \pm 0.71	9.86 \pm 1.68	0.391	0.0001	0.821
Total serum iron ($\mu\text{mol/L}$)	37.05 \pm 4.98	40.42 \pm 6.02	54.59 \pm 29.49	47.74 \pm 12.15	0.321	0.383	0.683

Values are expressed as mean \pm S.D., with Student's *t*-test, with statistical significance set at $p < 0.05$. CKD, chronic kidney disease; CH-FeCl, cross-linked iron chitosan III complex.

¹Control versus Control/CH-FeCl.

²Control versus CKD.

³CKD versus CKD/CH-FeCl.

use [29,30]. In our study, we demonstrated that the CH-FeCl polymer, a calcium-free, low-cost, and non-absorbable compound, significantly reduced the levels of serum phosphate in rats with CKD induced by an adenine-enriched diet.

The drug used in our study is a complex of cross-linked chitosan and Fe (III). The cross-linking process with glutaraldehyde renders the polymer insoluble at the acidic pH in the stomach, preventing the release of iron [20], which, as a transition metal, can establish a strong link to phosphate. The phosphate-chelating capacity of this non-absorbable polymer was demonstrated in previous animal and *in vitro* studies, with a serum phosphate reduction of 20%–40%, without promoting changes in serum iron levels [17–20]. However, although these animals presented elevated phosphate levels, they did not develop CKD, contrary to the animals in our study.

Our experimental model reproduced CKD phase 4, as classified by the National Kidney Foundation [31], with tubulointerstitial involvement, as indicated by polyuria (fig. 2).

Anaemia was present in the animals with CKD, but serum iron levels did not change with the introduction of the chelator, demonstrating the non-absorption of iron in the intestine.

The use of phosphate chelators is common and necessary in patients with dialytic CKD, as diet and dialysis alone are insufficient to control hyperphosphataemia. However, the capacity of these compounds to reduce phosphataemia is variable, with studies demonstrating a reduction in phosphate between 20% and 50%. In addition to the differing efficacies of the compounds, the adherence of patients to the use of phosphate chelators is also known to vary, making the maintenance of phosphate homeostasis a constant challenge [32–37]. Recently, iron-based drugs have been shown to promote a greater reduction in serum phosphate levels than the previously used chelators without causing calcium overload, making this class of drugs the target of studies to evaluate the impact on mortality in patients with CKD [38,39]. In the last week of our study, animals with CKD treated with CH-FeCl

4

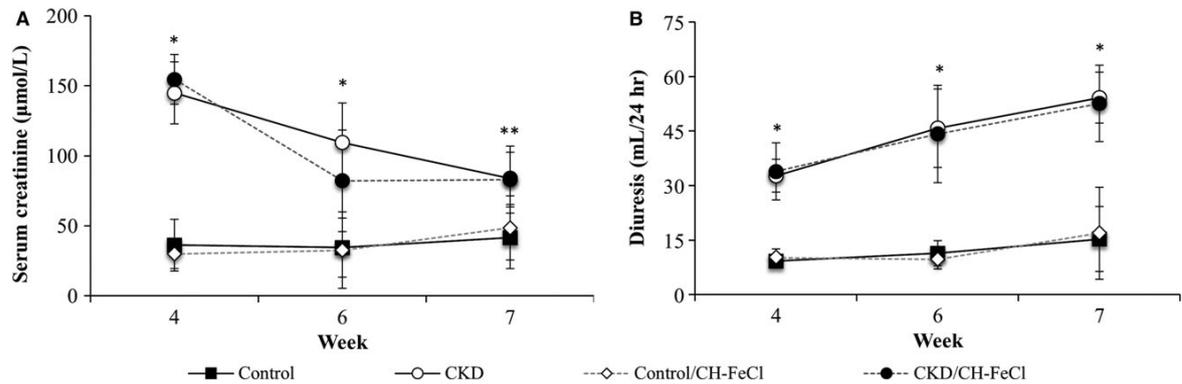
WANDER BARROS DO CARMO *ET AL.*

Fig. 2. Serum creatinine (A) and diuresis (B). Animals in the CKD groups presented with decreased renal function (higher serum creatinine) and greater diuresis compared to those in the control groups. The diet of the animals with CKD was enriched with 0.75% of adenine until week 4 and 0.1% of adenine between weeks 4 and 7. Groups were composed of 24 animals, and eight animals from each group were killed at weeks 4, 6 and 7. CH-FeCl, cross-linked iron chitosan III complex; CKD, chronic kidney disease. Values are expressed as mean \pm S.D. (*CKD and CKD/CH-FeCl groups *versus* Control and Control/CH-FeCl groups; $p < 0.0001$. **CKD *versus* Control, $p = 0.001$; CKD *versus* Control/CH-FeCl, $p = 0.005$; CKD *versus* CKD/CH-FeCl, $p = 0.888$).

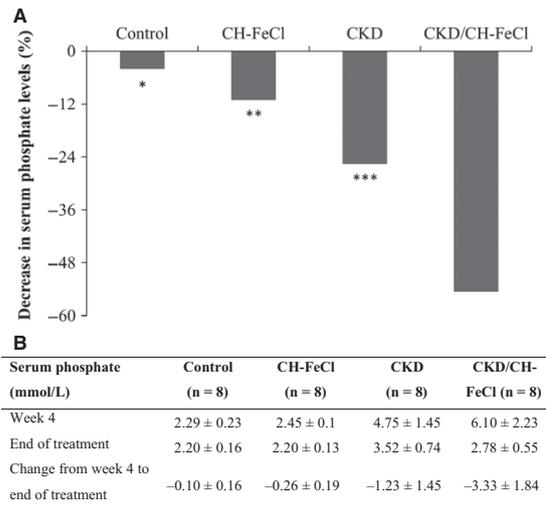


Fig. 3. Variation in serum phosphate levels. (A) Proportion of the decrease in the levels of serum phosphate between week 4 and week 7. * $p = 0.0001$; ** $p = 0.001$; *** $p = 0.021$, compared to the CKD/CH-FeCl group. (B) Variation in mean serum phosphate levels during the study between all groups. Values are expressed as mean \pm S.D., with statistical significance set at $p < 0.05$. Control: animals fed standard diet and treated with placebo; CH-FeCl: animals fed a standard diet and treated with cross-linked iron chitosan III (CH-FeCl); CKD: animals with diet-induced CKD, treated with placebo; CKD/CH-FeCl: animals with diet-induced CKD, treated with cross-linked iron chitosan III.

had 19% lower serum phosphate values than untreated CKD animals (table 1). This difference has been considered relevant in clinical studies, as it shows an association with improvement in CKD-MBD markers, possibly reducing the risk of vascular calcification [14,36,37,40,41]. Furthermore, in the present study, the animals with CKD treated with CH-FeCl also showed a significant 43% reduction in FEPi compared to

untreated CKD animals, indicating a reduction in kidney phosphate overload consistent with lower phosphate intestinal absorption and therefore, effective phosphate chelator activity (table 1). Notably, the two groups presented with similar levels of renal dysfunction.

The dose of CH-FeCl complex used in this study that was sufficient to produce a phosphate-chelating effect was equivalent to approximately 2 g/day for a person weighing 70 kg. This is half the typical dose of other chelators, such as sevelamer, calcium carbonate or acetate, bicalomer, and even PA21, used to reduce phosphataemia [33,34,38]. These data are of great importance when evaluating the treatment of patients with chronic conditions, as the possibility of reducing the dose or number of daily pills or tablets can increase adherence to treatment and improve quality of life in patients with CKD [42,43]. However, the results obtained with this dose need to be confirmed in larger studies in human beings.

Although our study had a longitudinal design, the variables evaluated were not collected through repeated measures in the same individual. Thus, the measurements performed in the studied groups at different times are subject to a potential interference from between-group heterogeneity throughout the follow-up. The partial recovery of renal function that was observed in CKD animals, even after the modification of the original CKD model by introducing adenine overload and the severe bone disease induced by this model, led to phosphate and calcium removal from the bone. This may explain why the difference in the serum phosphate levels between the CKD and CKD/CH-FeCl groups was clinically but not statistically significant.

In conclusion, we showed that treatment with a low dose of the CH-FeCl polymer had an effective phosphate chelation action by reducing intestinal phosphate absorption in uraemic rats. It would be interesting to test this compound in studies with human beings to investigate its efficacy, safety and impact on mortality in patients with CKD.

Acknowledgements

Wander Barros do Carmo was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisas em Nefrologia (IMEPEN). This study was carried out at the Universidade Federal de Juiz de Fora (Federal University of Juiz de Fora, UFJF), Juiz de Fora, MG, Brazil.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest related to this study.

References

- Levey AS, Inker LA, Coresh J. GFR estimation: from physiology to public health. *Am J Kidney Dis* 2014;**63**:820–34.
- Fraser SD, Roderick PJ, May CR, McIntyre N, McIntyre N, Fluck RJ *et al.* The burden of comorbidity in people with chronic kidney disease stage 3: a cohort study. *BMC Nephrol* 2015;**16**:1–11.
- Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA *et al.* Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007;**71**:31–8.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009;**113**:S1–S130.
- Block GA, Ix JH, Ketteler M, Martin KJ, Thadhani RI, Tonelli M *et al.* Phosphate homeostasis in CKD: report of a scientific symposium sponsored by the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 2013;**62**:457–73.
- Abramowitz M, Muntner P, Coco M, Southern W, Lotwin I, Hostetter TH *et al.* Serum alkaline phosphatase and phosphate and risk of mortality and hospitalization. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;**5**:1064–71.
- Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Selinger SL, Shlipak MG, Jenny NS *et al.* Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;**20**:381–7.
- Malberti F. Hyperphosphataemia: treatment options. *Drugs* 2013;**73**:673–88.
- Kalaitzidis RG, Elisaf MS. Hyperphosphatemia and phosphate binders: effectiveness and safety. *Curr Med Res Opin* 2014;**30**:109–12.
- Frazão JM, Adragão T. Non-calcium-containing phosphate binders: comparing efficacy, safety, and other clinical effects. *Nephrol Clin Pract* 2012;**120**:108–19.
- Goldsmith D, Covic A. Oral phosphate binders in CKD – is calcium the (only) answer? *Clin Nephrol* 2014;**81**:389–95.
- Wang C, Liu X, Zhou Y, Li S, Chen Y, Wang Y *et al.* New conclusions regarding comparison of sevelamer and calcium-based phosphate binders in coronary-artery calcification for dialysis patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE* 2015;**10**:1–15.
- Kakuta T, Tanaka R, Hyodo T, Suzuki H, Kanai G, Nagaoka M *et al.* Effect of sevelamer and calcium-based phosphate binders on coronary artery calcification and accumulation of circulating advanced glycation end products in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2011;**57**:422–31.
- Block GA, Fishbane S, Rodriguez M, Smits G, Shermesh S, Pergola PE *et al.* A 12-week, double-blind, placebo-controlled trial of ferric citrate for the treatment of iron deficiency anemia and reduction of serum phosphate in patients with CKD Stages 3–5. *Am J Kidney Dis* 2015;**65**:728–36.
- Lewis JB, Sika M, Kory MJ, Chuang P, Schulman G, Smith MT *et al.* Ferric citrate controls phosphorus and delivers iron in patients on dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2015;**26**:493–503.
- Yagil Y, Fadem SZ, Kant KS, Bhatt U, Sika M, Lewis JB *et al.* Managing hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease on dialysis with ferric citrate: latest evidence and clinical usefulness. *Ther Adv Chronic Dis* 2015;**6**:252–63.
- Negri AL, Ureña Torres PA. Iron-based phosphate binders: do they offer advantages over currently available phosphate binders? *Clin Kidney J* 2015;**8**:161–7.
- Baxter J, Shimizu F, Takiguchi Y, Wada M, Yamaguchi T. Effect of iron(III) chitosan intake on the reduction of serum phosphorus in rats. *J Pharm Pharmacol* 2000;**52**:863–74.
- Bürger C, Valcarengi D, Sandri S, Rodrigues CA. Cross-linking chitosan-Fe(III), an oral phosphate binder: studies in vitro and in vivo. *Int J Pharm* 2001;**223**:29–33.
- Schöninger LM, Dall Oglia RC, Sandri S, Rodrigues CA, Bürger C. Chitosan iron(III) reduces phosphorus levels in alloxan diabetes-induced rats with signs of renal failure development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;**106**:467–71.
- Fagundes T, Bernardi EL, Rodrigues CA. Phosphate adsorption on chitosan-Fe(III)-crosslinking: batch and column studies. *J Liq Chrom Rel Technol* 2001;**24**:1189–98.
- Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 1986;**44**:230–4.
- Terai K, Mizukami K, Okada M. Comparison of chronic renal failure rats and modification of the preparation protocol as a hyperphosphataemia model. *Nephrol* 2008;**13**:139–46.
- Damment S, Secker R, Shen V, Lorenzo V, Rodriguez M. Long-term treatment with lanthanum carbonate reduces mineral and bone abnormalities in rats with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2011;**26**:1803–12.
- Jones-Bolin S. Guidelines for the care and use of laboratory animals in biomedical research. *Curr Protoc Pharmacol* 2012;. <https://doi.org/10.1002/0471141755.pha04bs59>.
- Anderson S, Meyer TW. Pathophysiology and nephron adaptation in chronic renal failure. In: Schrier RW, Gottschalk CW, (eds). *Diseases of the Kidney*. Little Brown and Company, New York, NY, 1997; 2555–79.
- Rosenbaum DP, Holmes-Farley SR, Mandeville WH, Pitruzzello M, Goldberg DI. Effect of Renagel®, a non-absorbable, cross-linked, polymeric phosphate binder, on urinary phosphorus excretion in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1997;**12**:961–4.
- Pennick M, Poole L, Dennis K, Smyth M. Lanthanum carbonate reduces urine phosphorus excretion: evidence of high-capacity phosphate binding. *Ren Fail* 2012;**34**:263–70.
- Shigematsu T, Ohya M, Negi S, Masumoto AR, Nakashima YM, Iwatani Y *et al.* Safety and efficacy evaluation of lanthanum carbonate for hyperphosphatemia in end-stage renal disease patients. *Contrib Nephrol* 2015;**185**:42–55.
- Hutchison AJ, Wilson RJ, Garafola S, Copley JB. Lanthanum carbonate: safety data after 10 years. *Nephrology* 2016;**21**:987–94.
- Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K *et al.* The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011;**80**:17–28.
- Yusuf AA, Howell BL, Powers CA, St Peter WL. Utilization and cost of medication associated with CKD mineral and bone disorder in dialysis patients enrolled in Medicare Part D. *Am J Kidney Dis* 2014;**64**:770–80.
- Bleyer AJ, Burke SK, Dillon M, Garrett B, Kant KS, Lynch D *et al.* A comparison of the calcium-free phosphate binder sevelamer hydrochloride with calcium acetate in the treatment of hyperphosphatemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999;**33**:694–701.

- 34 Akizawa T, Origasa H, Kameoka C, Kaneko Y, Kanoh H. Dose-finding study of bicalomer in patients with chronic kidney disease on hemodialysis with hyperphosphatemia: a double-blind, randomized, placebo-controlled and sevelamer hydrochloride-controlled open-label, parallel group study. *Ther Apher Dial* 2014;**18**(Suppl 2):24–32.
- 35 Van Buren PN, Lewis JB, Dwyer JP, Greene T, Middleton J, Sika M *et al.* The phosphate binder ferric citrate and mineral metabolism and inflammatory markers in maintenance dialysis patients: results from prespecified analyses of a randomized clinical trial. *Am J Kidney Dis* 2015;**66**:479–88.
- 36 Koiwa F, Terao A. Dose-response efficacy and safety of PA21 in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia: a randomized, placebo-controlled, double-blind, Phase II study. *Clin Exp Nephrol* 2016;**21**:513–22.
- 37 Floege J, Covic AC, Ketteler M, Mann JF, Rastogi A, Spinowitz B *et al.* Long-term effects of the iron-based phosphate binder, sucroferric oxyhydroxide, in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2015;**30**:1037–46.
- 38 Palmer SC, Gardner S, Tonelli M, Mavridis D, Johnson DW, Craig JC *et al.* Phosphate-binding agents in adults with CKD: a network meta-analysis of randomized trials. *Am J Kidney Dis* 2016;**68**:691–702.
- 39 Yaguchi A, Yonekubo S, Maruyama I, Tatemichi S, Maruyama K, Kobayashi M. Comparison of phosphate binding capacities of PA21, a novel phosphate binder, with those of other phosphate binders in vitro and in vivo. *Drug Res (Stuttg)* 2016;**66**:262–9.
- 40 Navaneethan SD, Plamer SC, Craig JC, Elder GJ, Strippoli GF. Benefits and harms of phosphate binders in CKD: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis* 2009;**54**:619–37.
- 41 Liu L, Wang Y, Chen H, Zhu X, Zhou L, Yang Y. The effects of non-calcium phosphate binders versus calcium-based phosphate binders on cardiovascular calcification and bone remodeling among dialysis patients: a meta-analysis of randomized trials. *Ren Fail* 2014;**36**:1244–52.
- 42 Chiu YW, Teitelbaum I, Misra M, de Leon EM, Adzize T, Mehrotra R. Pill burden, adherence, hyperphosphatemia, and quality of life in maintenance dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;**4**:1089–96.
- 43 Wang S, Alfieri T, Ramakrishnan K, Braunhofer P, Newsome BA. Serum phosphorus levels and pill burden are inversely associated with adherence in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2014;**29**:2092–9.



CERTIFICADO

CBN 2014
BELO HORIZONTE - MG

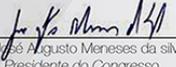
XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE
NEFROLOGIA
VI CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE NEFROLOGIA
24 A 27 DE SETEMBRO DE 2014
EXPOMINAS - BELO HORIZONTE - MG
BRASIL

Certificamos que
BÁRBARA BRUNA ABREU DE CASTRO, WANDER BARROS DO CARMO, LÚISA CARDOSO MANSO, LEONARA BEATRIZ FAYER DE ALMEIDA, ALLYNE MARCHIONI JUSTE, JOÃO LUIS CARVALHO TRICOTE DOS SANTOS, PAULO GIOVANNI DE ALBUQUERQUE SUASSUNA, CLOVIS ANTONIO RODRIGUES, HÉLADY SANDERS-PINHEIRO

compareceu ao XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia e VI Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia, realizados entre os dias 24 e 27 de setembro de 2014, no Expominas em Belo Horizonte - Minas Gerais na qualidade de

AUTOR(ES): DO TEMA LIVRE COM O TÍTULO: NOVO QUELANTE DE FÓSFORO E SUA AÇÃO NA CALCIFICAÇÃO VASCULAR EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA RENAL CRÔNICA - ESTUDO PILOTO.

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2014


Dr. José Augusto Meneses da Silva
Presidente do Congresso


Daniel Pinakli dos Santos
Presidente da SBN


Roberto Flávio Silva Pecoits Filho
Diretor Científico do Congresso

REALIZAÇÃO



CERTIFICADO

CBN 2014
BELO HORIZONTE - MG

XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE
NEFROLOGIA
VI CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE NEFROLOGIA
24 A 27 DE SETEMBRO DE 2014
EXPOMINAS - BELO HORIZONTE - MG
BRASIL

Certificamos que
BÁRBARA BRUNA ABREU DE CASTRO, WANDER BARROS DO CARMO, LÚISA CARDOSO MANSO, LEONARA BEATRIZ FAYER DE ALMEIDA, ALLYNE MARCHIONI JUSTE, JOÃO LUIS CARVALHO TRICOTE DOS SANTOS, PAULO GIOVANNI DE ALBUQUERQUE SUASSUNA, HÉLADY SANDERS-PINHEIRO

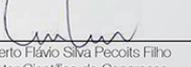
compareceu ao XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia e VI Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia, realizados entre os dias 24 e 27 de setembro de 2014, no Expominas em Belo Horizonte - Minas Gerais na qualidade de

AUTOR(ES): DO TEMA LIVRE COM O TÍTULO: MODELO EXPERIMENTAL DE UREMIA COM CALCIFICAÇÃO VASCULAR POR ADIÇÃO DE ADENINA E ALTO TEOR DE FÓSFORO NA DIETA

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2014


Dr. José Augusto Meneses da Silva
Presidente do Congresso


Daniel Pinakli dos Santos
Presidente da SBN


Roberto Flávio Silva Pecoits Filho
Diretor Científico do Congresso

REALIZAÇÃO



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho Caracterização laboratorial do distúrbio mineral-ósseo em modelo animal de Doença Renal Crônica de autoria de Wander B. Carmo, Bárbara B. A. Castro, Luísa C. Manso, Allyne M. Juste, João L. C. T. Santos, Paulo G. A. Suassuna, Pinheiro H.S. foi apresentado no formato pôster durante o 11º Congresso Mineiro de Nefrologia realizado no período de 20 a 23 de maio de 2015, instalado no Centro de Artes e Convenções da UFOP, em Ouro Preto, Minas Gerais.

Belo Horizonte, 23 de maio de 2015.


 Prof.ª Dra. Hélydy Sanders Pinheiro
 Presidente do 11º Congresso Mineiro de Nefrologia


 Dr. José de Resende Barros Neto
 Presidente da Sociedade Mineira de Nefrologia

Realização



Apoio



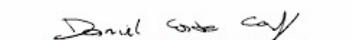
Verifique o código de autenticidade 282745.045576.22690.8 em <https://www.aven3.com.br/documentos>



*C*ertificado

Certificamos que o trabalho intitulado **Ação de quelante a base de ferro sobre o FGF23 e a doença óssea em ratos urêmicos** de autoria de Bárbara Bruna Abreu de Castro, Wander Barros do Carmo, Paulo Giovanni de Albuquerque Suassuna, Vanda Jorgetti, Melani Ribeiro Custodio e Hélydy Sanders Pinheiro, foi apresentado como Tema Livre e classificado como melhor trabalho da categoria durante o 12º Congresso Mineiro de Nefrologia e 3º Simpósio Mineiro de Transplante Renal, realizado no período de 25 a 27 de maio de 2017, no Centro de Artes e Convenções da UFOP, em Ouro Preto, Minas Gerais.

Ouro Preto, 27 de maio de 2017.


 Dr. Daniel Costa Chalabi Calazans
 Presidente da Sociedade Mineira de Nefrologia


 Dr. José Muniz Pazeli Júnior
 Presidente do 12º Congresso Mineiro de Nefrologia



Apoio

